



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Detección e identificación molecular de *Leishmania*
(*Viannia*) *guyanensis* en garrapatas de la especie
Rhipicephalus (Boophilus) microplus colectadas de
Pecari tajacu, Madre de Dios**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología

Molecular

AUTOR

Jesús Eduardo ROJAS JAIMES

ASESOR

Fernando Abilio MERINO RAFAEL

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Rojas J. Detección e identificación molecular de *Leishmania (Viannia) guyanensis* en garrapatas de la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* colectadas de Pecari tajacu, Madre de Dios [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado; 2017.

602



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO



Exped. N° 130-UPG-FCB-2016

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE MAGÍSTER
EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Siendo las 15:15 horas del día 18/04/17 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por:

Dr.	Armando Yarleque Chocas	e integrado por
Mg.	Edith Fanincia Rodríguez Quispe	(Miembro)
Mg.	William Henry Roldán Gonzáles	(Miembro)
Dra.	Diana Fernanda Silva Dávila	(Miembro)
Mg.	Fernando Abilio Merino Rafael	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara el Bachiller Don JESÚS EDUARDO ROJAS JAIMES.

Después de darse lectura al Expediente N° 130-UPG-FCB-16, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis titulada:

"Detección e identificación molecular de *Leishmania (Viannia) guyanensis* en garrapatas de la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* colectadas de *Pecari tajacu*, Madre de Dios"

y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

Agradecimientos

Al Dr. Andrés Lescano, Dr. Maxy de los Santos y Vet. Jocelyn Perez que me apoyaron en el NAMRU 06 para el desarrollo de la presente investigación.

Al Blgo. Leonardo Mendoza del Laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud por la clasificación taxonómica de las garrapatas.

Al Blgo. German Correa Nuñez de la Universidad Amazónica de Madre de Dios por el apoyo en el trabajo de campo y las sugerencias para mejorar la redacción.

A los biólogos y estimados compañeros Nishon Rojas Palomino y Omar Caceres Rey del laboratorio de biotecnología y biología molecular del Instituto Nacional de Salud por el apoyo en la identificación molecular de la especie de *Leishmania* sp.

A los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas y del Instituto de Medicina Tropical de la UNMSM Armando Yarleque Chocas, Edith Rodríguez Quispe, Fernando Merino Rafael, William Roldán Gonzáles y Diana Silva Dávila por sus consejos y correcciones en la presente redacción.

Y finalmente a la organización TReeS Perú-Inglaterra por financiar parte del presente trabajo.

Dedicatorias

A la luz que Dios me brinda día a día que es mi Madre, a mi Padre que me guía desde arriba y mi hermana Charo que es como si segunda mama y mis hermanos que le dan a mi vida el contraste de un gran camino.

CONTENIDO

1.-Introducción-----	13
2.-Antecedentes-----	15
3.-Justificación del estudio-----	38
4.-Hipótesis-----	39
5.-Objetivos-----	40
6.-Materiales y Métodos-----	41
7.-Resultados-----	48
8.-Discusión-----	67
9.-Conclusiones-----	73
10.-Recomendaciones-----	73
11.-Referencias Bibliográficas-----	74
12.-Anexos-----	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.-*Lutzomyia davisi* hembra repleta de huevos. Aumento 400X. Vector de *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Viannia) naiffi*. Fuente: Gil *et al.*, 2009

Figura 2.- Ciclo biológico del *Leishmania* sp. Del 1 al 9 ciclo del parasito en ser humano y perro (reservorio). Del 10 al 15 ciclo del parásito en el insecto vector. Fuente: Alvar, 2001

Figura 3.-Leishmaniasis cutánea con una lesión satélite.

Figura 4.-Leishmaniasis cutánea multifocal.

Figura 5.-Leishmaniasis cutánea difusa.

Figura 6.-Leishmaniasis mucosa en fosa nasal derecha. Fuente: Montenegro-Idrogo *et al.*, 2014

Figura 7.-Cuadro clínico de leishmaniasis visceral, con hepatoesplenomegalia. Fuente: OPS, 2013

Figura 8.- Distribución de la leishmaniasis en el Perú al 2016

Figura 9.- Leishmaniasis por departamentos, periodos 2015-2016

Figura 10.- Casos de leishmaniasis en el Perú según tipo desde el 2000 al 2016

Figura 11.- Detección por microscopia de amastigotes de *Leishmania* sp. a 1000X, teñidos con colorante Giemsa.

Figura 12.- Promatigotes de *Leishmania* (V.) *braziliensis* en medio de cultivo observados bajo microscopio de contraste de fases. Fuente: Minaya *et al.*, 1997

Figura 13.- Leishmaniasis en modelo animal. Fuente: Nieto *et al.*, 2011

Figura 14.- Detección molecular por PCR para kDNA de *Leishmania* (*Viannia*):Carril 1 control positivo (70pb) *L. braziliensis*, carril 2 agua, carril 3 positivo, carril 4 positivo débil, carril 5 positivo muy débil y carril 6 marcador molecular de 150 y 100 pb. Fuente: López *et al.*, 1993

Figura 15.- PCR en Tiempo real amplificando el gen de la Manosa Fosfato Isomerasa de diferentes especies de *Leishmania* sp. Fuente: Tsukayama *et al.*, 2013

Figura 16.- PCR en Tiempo real amplificando el gen de la 6 Fosfogluconato Deshidrogenasa para identificar diferentes especies de *Leishmania* sp.
Fuente: Tsukayama *et al.*, 2013

Figura 17.- Zonas Económicas y las localizaciones donde se realizaron las Colectas (Fuente: ZEE-MDD, 2009)

Figura 18.- Garrapatas "*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*" recolectadas de *Pecari tajacu* mostrando diversos tamaños a escala con la regla de 20 centímetros, donde se puede observar una ninfa (flecha de color azul) y un adulto hembra (flecha de color rojo).

Figura 19.-. Detección por PCR de kDNA de *Leishmania (Viannia)* en garrapatas de animales silvestres cazados. La electroforesis en gel de agarosa muestran los productos amplificados de 70 pb del PCR kDNA. En el gráfico de la izquierda la primera columna muestra el ladder de 200pb a 50pb. El control positivo corresponde a ADN de *L. (V.) braziliensis* cepa (MHOM/BR/84/LTB300); y el control negativo corresponde a ADN humano negativo para *Leishmania* sp.

Figura 20.- Análisis HRM de garrapatas positivas a kDNA

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Cuadro referencial del vínculo entre la especie de *Leishmania* sp. y el cuadro clínico que puede causar. Fuente: Alvar, 2001.

Tabla 2.- Garrapatas recolectadas y clasificadas taxonómicamente según Barros-Battesti (2006)

Tabla 3.- Análisis Molecular del ADN kinetoplasto de *Leishmania* sp. en las garrapatas.

Tabla 4.- Garrapatas de acuerdo a los hospederos, localización de caza y resultados de PCR kDNA.

Tabla 5.- Se muestra la relación entre el color y muestra usada en el HRM, debido a que el punto de corte de similitud entre las curvas de la muestra y control positivo es de 90%, la variación > 10% entre una muestra y el control descarta la similitud.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

kDNA: Kinetoplasto del ácido desoxirribonucleico.

PCR-HRM: Reacción en cadena de disociación de alta resolución.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de polimerasa (Polimerase chain reaction).

rpm: Revoluciones por minuto.

μl: Microlitro.

μM: Micromolar.

ng: Nanogramos.

mg: Miligramos.

V: Voltios.

RESUMEN

En estudios previos en países como Brasil e Italia se ha detectado la presencia de *Leishmania* sp. en garrapatas colectadas de zonas endémicas de leishmaniasis en ausencia del vector natural, *Lutzomyia* sp., presumiendo un probable vínculo entre las garrapatas y la enfermedad. Con el propósito de identificar las especies de *Leishmania* sp. en garrapatas en una zona endémica de leishmaniasis “donde se reporta varios casos de leishmaniasis cutánea causadas por las picaduras de garrapatas en la Amazonía de Madre de Dios, Perú, según la información de algunos pobladores”, se desarrolló la presente investigación como parte de un proyecto ligado al tema apoyado en la biología molecular. Con este objetivo se examinaron muestras de garrapatas obtenidas de porcinos silvestres. Pobladores locales cazaron para subsistencia tres *Tapirus terrestris* (“tapir o sachavaca”) y tres *Pecari tajacu* (“sajino”) en los distritos de Tahuamanú y Las Piedras, respectivamente. Se obtuvieron 81 garrapatas: 14 *Amblyomma naponense*, 18 *Amblyomma sculpturatum*, 3 *Amblyomma oblongoguttatum*, 4 *Amblyomma latepunctatum*, 1 *Amblyomma ovale*, y 41 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Luego de la identificación macroscópica y microscópica de los especímenes, se procedió a extraer el DNA y se identificó por PCR el kDNA de *Leishmania* (*Viannia*) en tres *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* colectadas de *Pecari tajacu* y en una de ellas por PCR-HRM se pudo identificar a *Leishmania* (*V.*) *guyanensis*, agente causal de la leishmaniasis cutánea. Por lo tanto estos hallazgos amplían la información y distribución de *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* encontrado en *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en zonas silvestres y que podrían vincularse a nuevas formas de transmisión del agente causal de la enfermedad, argumentando la importancia del estudio de las garrapatas y su relación como agente transmisor de *Leishmania* sp.

Palabras claves: Leishmaniosis, PCR-kDNA, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, *Tapirus terrestris*, *Pecari tajacu*.

ABSTRACT

Previous studies in Brazil and Italy show the identification of *Leishmania* sp. in ticks that were collected in endemic areas of leishmaniasis in the absence of natural vector *Lutzomyia* sp. presuming a probable link between this arthropod and disease. In order to identify the species of *Leishmania* sp. ticks in an endemic area of leishmaniasis "where several cases of cutaneous leishmaniasis caused by tick bites are reported by some patients in the Amazon region of Madre de Dios, Peru". The hunters hunted for subsistence three *Tapirus terrestris* ("tapir o sachavaca ") and three *Pecari tajacu* ("sajino") in the districts of Tahuamanú and Las Piedras, respectively. 14 *Amblyomma naponense*, 18 *Amblyomma scalpturatum*, 3 *Amblyomma oblongoguttatum*, 4 *Amblyomma latepunctatum* 1 *Amblyomma ovale* and 41 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks were obtained.

We identified by PCR kDNA *Leishmania* (V) in three *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from *Pecari tajacu* and in one of them PCR-HRM was able to identify *Leishmania* (V) *guyanensis*, causal agent of cutaneous leishmaniasis . Therefore these findings extend the information and distribution of *Leishmania* (V) *guyanensis* found in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in wild areas and that could be linked to new forms of transmission of the causative agent of the disease, arguing the importance of studying ticks and their relationship as transmitting agent of *Leishmania* sp.

Keywords: leishmaniasis, PCR-kDNA, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Tapirus terrestris*, *Pecari tajacu*.

1.-INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida según la OMS, causada por protozoarios del género *Leishmania* sp., y son transmitidos a los mamíferos por dípteros hembras de los géneros *Lutzomyia* sp., *Phlebotomus* sp. y *Sergentomya* sp. (Rojas 2012; Berdjane-Broux *et al.*, 2012). El parásito tiene un ciclo de vida dimórfico residiendo en forma extracelular como promastigotes en el insecto vector, y en forma intracelular como amastigote en los macrófagos de los mamíferos. Existen dos subgéneros *Leishmania* y *Viannia* dependiendo donde se reproduzca en el insecto vector (Shaw, 1994). El riesgo de transmisión de la enfermedad se incrementa por la presencia de roedores reservorios de los géneros *Microtus guentheri* “topillo común” y *Meriones tristrami* “gerbil”, el marsupial *Didelphis marsupialis* “zarigüeya” y *Dasypus novemcinctus* “armadillo” que se mantienen aparentemente asintomáticos (Faiman *et al.*, 2013; Lainson *et al.*, 1989; Schallig *et al.*, 2007).

Las garrapatas que pertenecen al orden Ixodida son ectoparásitos que succionan sangre de vertebrados y pueden transmitir un gran número de patógenos a los seres humanos y animales domésticos y causando una gran variedad de las enfermedades zoonóticas. Las garrapatas pueden ser plagas de importancia en salud pública en regiones tropicales y subtropicales (Chen *et al.*, 2014). Los patógenos transmitidos son, entre otros, virus, bacterias y protozoarios (Goncalves, 2014). Existen más de 900 especies de garrapatas clasificadas a nivel mundial dentro de dos familias principales: Ixodidae (garrapatas duras) y Argasidae (garrapatas blandas) (Chen *et al.*, 2014)

Rhipicephalus (Boophilus) microplus es un ectoparásito que pertenece a la familia Ixodidae y se encuentra parasitando ovejas y ganado vacuno (Chen *et al.*, 2014). *Rhipicephalus (B.) microplus* posee gran capacidad invasiva debido a su gran movilidad para buscar alimento. Su distribución es amplia abarcando por lo menos 3 continentes como América, África y Oceanía (Madder *et al.*, 2012). Desde el punto de vista económico, *R. (B.) microplus* provoca notable pérdida en la ganadería bovina y ovina no solo por la anemia en los animales causada por la succión de la sangre a los animales sino por la transmisión de patógenos que causan enfermedades como la babesiosis y anaplasmosis (Guerrero, 2014).

Por tanto, el presente trabajo constituye una contribución en la investigación de *Leishmania* sp., en garrapatas de las cuales se desconoce aun el vinculo que estas podrían tener en la transmisión del parásito al humano, remarcando que las garrapatas enmarcadas en nuestro estudio han sido reportadas como un artrópodo común que constatemente pica a la población local de Madre de Dios, además de presentar algunas características como encontrarse ampliamente distribuidas a nivel mundial, presentar una picadura desapercibida, encontrándose varias horas activas durante el día, pudiendo estar impregnada por periodos largos succionando grandes volúmenes de sangre y siendo capaces de transmitir diferentes agentes etiológicos al humano. Nuestra investigación presenta aportes importantes y es inédito en el estudio de la leishmaniasis en el ciclo silvestre identificando por primera vez mediante la biología molecular a la especie patógena *Leishmania guyanensis* en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* colectada de *Pecari tajacu*, animales de vida silvestre, especie denominada comúnmente como “sajino”, que es usado en la alimentación de los pobladores de las zonas.

2.-ANTECEDENTES

TAXONOMÍA

Los parásitos del genero *Leishmania* sp. se clasifican como:

Reino PROTISTA,

Subreino PROTOZOA,

Filo SARCOMASTIGOPHORA,

Subfilo MASTIGOPHORA,

Clase ZOOMASTIGOPHOREA,

Orden KINETOPLASTIDA,

Suborden TRYPANOSOMATINA,

Familia TRYPANOSOMATIDAE,

Género *Leishmania*, que incluye al menos 15 especie patógenas para el ser humano dentro de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (Ceccarelli *et al.*, 2014; Díaz *et al.*, 2008)

CICLO BIOLOGICO Y MORFOLOGÍA DEL PARÁSITO

El vector natural de *Leishmania* sp. son dípteros pertenecientes a la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae, genero *Phlebotomus* en el viejo mundo “África y Europa” y *Lutzomyia* en el nuevo mundo “América”. Morfológicamente, *Lutzomyia* es un insecto de 3 a 5 milímetros de longitud que en estado de reposo pliegan sus alas en forma de V, poseen un cuerpo cubierto de cerdas y tienen patas largas. Solo las hembras son hematófagas y son capaces de transmitir parásitos del genero *Leishmania* a través de su picadura (Figura 1) (Díaz *et al.*, 2008).



Figura 1.- *Lutzomyia davisi* hembra repleta de huevos. Aumento 400X. Vector de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* y *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi*. Fuente: Gil *et al.*, 2009

Los parásitos del genero *Leishmania* pueden diferenciarse en las formas de promastigote y amastigote.

Los amastigotes están adaptados a la temperatura humana y al medio ácido de los fagolisosomas de los macrófagos donde residen, a diferencia del promastigote extracelular y móvil que se encuentra en el invertebrado vector, exactamente en el sistema digestivo donde se dividen por fisión binaria con una longitud de 20 micras y de 1 a 2 micras de ancho con un núcleo central y un kinetoplasto terminal o subterminal y en la parte anterior del parásito se origina un flagelo, casi de igual tamaño que el cuerpo (Díaz *et al.*, 2008; Shapiro, 1993)

Después que 20 a 200 parásitos son introducidos por el vector en el hospedero humano o reservorio (asintomáticos), como el perro a través de la picadura en forma de promastigote (Kumar *et al.*, 2012), se realiza un proceso de diferenciación en la forma de amastigote inmóvil dentro de células mononucleares, principalmente en los macrófagos midiendo entre 2 a 3 micras de diámetro, seguidamente *Leishmania* sp. se comienza a dividir por fisión binaria y cuando alcanza un número aproximado de 20 parásitos lisa la célula quedando en el espacio extracelular para una nueva infección de células mononucleares (Figura 2). El núcleo de *Leishmania* sp. es relativamente central y se encuentra cerca al kinetoplasto, una estructura mitocondrial especializada que contiene ADN extranuclear (kDNA). El parásito posee en el kinetoplasto alrededor de 50 maxicirculos entre 30 a 40 kilobases con secuencia variable y otra conservada con función análoga al ADN mitocondrial codificando ARN mitocondrial y algunas proteínas (Shapiro, 1993). Además en el kinetoplasto se encuentran entre 10 000 a 20 000 minicirculos de ADN con 450 a 2500 pares de bases con secuencia variable del 80% dentro del kinetoplasto y con la función de codificar moléculas de ARN guías en la edición de los transcritos del maxicirculo que generan fragmentos de lectura abierta funcionales. Asociado al kinetoplasto se encuentra un flagelo rudimentario o rizoplasto que no se extiende fuera del parásito.

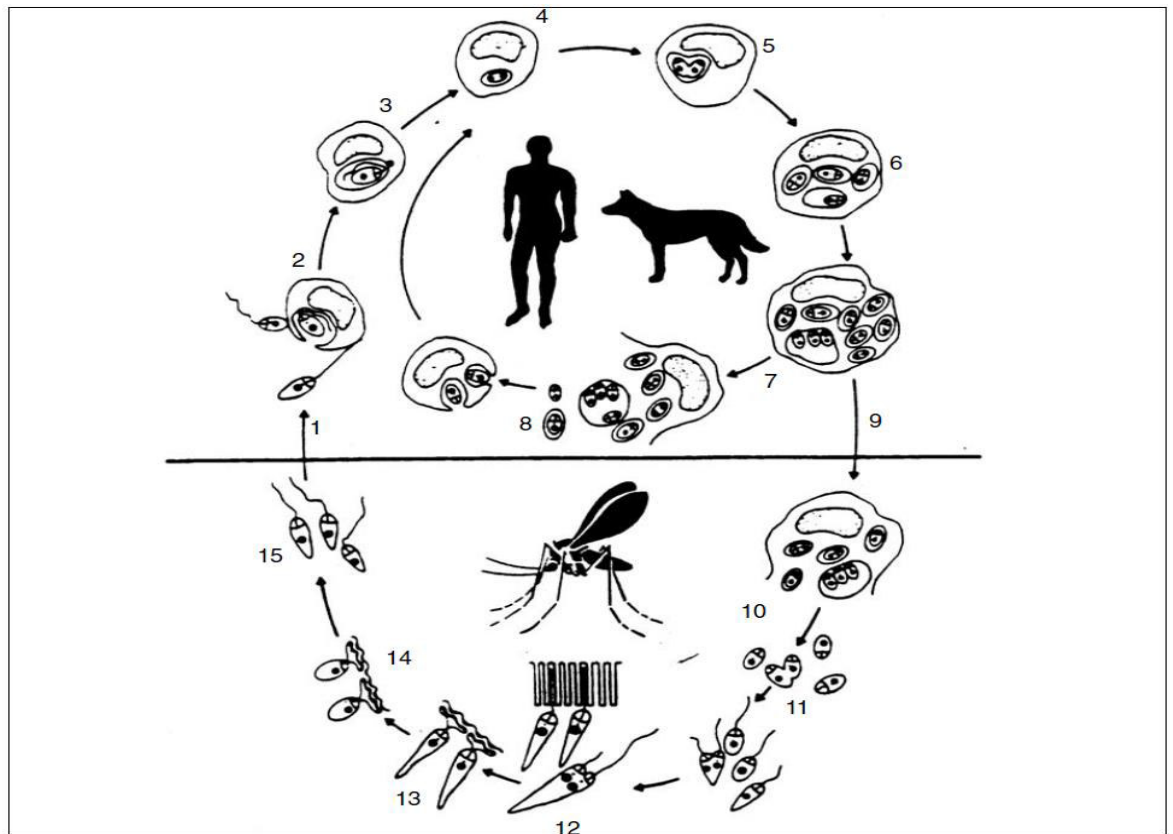


Figura 2.- Ciclo biológico del *Leishmania* sp. Del 1 al 9 ciclo del parásito en ser humano y perro (reservorio). Del 10 al 15 ciclo del parásito en el insecto vector. Fuente: Alvar, 2001

CLÍNICA DE LA LEISHMANIASIS

Existen diferentes manifestaciones clínicas asociadas a diferentes grados de migración del parásito (Tabla 1).

Tabla 1.- Cuadro referencial del vínculo entre la especie de *Leishmania* sp. y el cuadro clínico que puede causar. Fuente: Alvar, 2001.

<i>LEISHMANIASIS VISCERALES</i>	
Viejo Mundo <i>ANTROPONÓTICAS</i> <i>L. donovani</i> <i>ZOONÓTICAS</i> <i>L. infantum</i> Nuevo Mundo <i>ZOONÓTICAS</i> <i>L. chagasi</i>	Leishmaniasis visceral Leishmaniasis dérmica post-kala-azar Leishmaniasis visceral Leishmaniasis visceral
<i>LEISHMANIASIS CUTÁNEAS</i>	
Viejo Mundo <i>ANTROPONÓTICAS</i> <i>L. tropica</i> <i>ZOONÓTICAS</i> <i>L. major</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i> Nuevo Mundo <i>ZOONÓTICAS</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) peruviana</i>	Leishmaniasis cutánea endémica antroponótica urbana Leishmaniasis cutánea recidivante Leishmaniasis cutánea epidémica zoonótica rural Leishmaniasis cutánea Leishmaniasis mucocutánea Leishmaniasis cutánea difusa Leishmaniasis cutánea Leishmaniasis cutánea Úlcera de los chicleros Leishmaniasis cutánea Leishmaniasis cutánea difusa Leishmaniasis cutánea Leishmaniasis mucocutánea Leishmaniasis cutánea Leishmaniasis mucocutánea Leishmaniasis cutánea Leishmaniasis cutánea difusa Leishmaniasis mucocutánea Leishmaniasis cutánea

Las especies como *Leishmania major* y *Leishmania peruviana* provocan lesiones cutáneas y aparecen como un eritema en el sitio de inoculación por el insecto vector. Después de un periodo de incubación que puede variar de dos semanas a tres meses, del eritema se forma una pápula que posteriormente se ulcera en un periodo de dos semanas a seis meses; la herida generalmente no provoca dolor y es de forma oval, aunque en algunas ocasiones es de forma verrugosa (Arévalo *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2014). Las figuras 3,4 y 5 muestran diferentes grados de leishmaniasis cutánea en humanos.



Figura 3.-Leishmaniasis cutánea con una lesión satélite.



Figura 4.-Leishmaniasis cutánea multifocal.



Figura 5.-Leishmaniasis cutánea difusa.

La leishmaniasis mucosa es principalmente causada por *L. braziliensis* y es el resultado de un proceso metastásico de una zona local hacia las mucosas, principalmente de la nariz, orofaringe y nasofaringe donde intervienen tanto los factores de virulencia del parásito, pero también los factores inmunológicos del paciente. Esta enfermedad es endémica en Brasil, Perú y Bolivia y la presentación clínica involucra el daño de las mucosas, siendo destruidas en etapa crónica; por tanto, este cuadro clínico ocasiona un daño físico y psicológico a las personas que lo padecen, además de presentar en muchos casos falla diagnóstica y terapéutica por la baja parasitemia y la resistencia farmacológica respectivamente (Figura 6) (Arévalo *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2002; García de Marcos *et al.*, 2007; Mcgwire *et al.*, 2014).



Figura 6.- Leishmaniasis mucosa en fosa nasal derecha. Fuente: Montenegro-Idrogo *et al.*, 2014

Así mismo, la leishmaniasis visceral es causada por *Leishmania donovani* en el viejo mundo y por *Leishmania infantum* y *Leishmania chagasi* en el nuevo mundo, siendo el perro el reservorio principal (Montalvo, 2010). En el Perú hasta la fecha no se ha reportado este tipo de leishmaniasis (DGE, 2016). La leishmaniasis visceral está catalogada como la segunda en mortalidad y la cuarta en morbilidad entre las enfermedades tropicales según la OMS, con 20,000 a 40,000 muertes a nivel mundial por año. Entre los síntomas usuales están la hepatomegalia, fiebre alta, pancitopenia, hipergamaglobulemia, hemorragia secundaria y complicaciones infecciosas (Figura 7) (Bern *et al.*, 2010), siendo casi siempre fatal si no es tratada a tiempo (MacCall *et al.*, 2013).



Figura 7.-Cuadro clínico de leishmaniasis visceral, con hepatoesplenomegalia.

Fuente: OPS, 2013

EPIDEMIOLOGIA DE LA LEISHMANIASIS

Según reportes de la Organización Mundial de la Salud existen 1,3 millones de casos nuevos y entre 20, 000 a 30, 000 muertes ocurren anualmente (OMS, 2015).

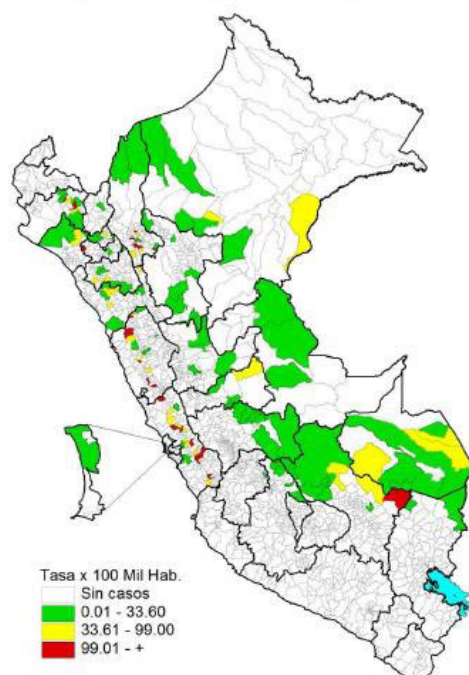
En el Perú, la morbilidad promedio del 2013 al mes de abril del 2016 fue de 6903, 6851, 5955 y 1208 respectivamente (Figuras 8, 9 y 10) (DGE, 2016).

Las zonas de mayor prevalencia se encuentran en la selva oriental, específicamente las regiones como Loreto, Ucayali y Madre de Dios además de una zona focalizada en la región Cusco que colinda con Madre de Dios y Puno, como se observa en la figura 8.

Las formas clínicas presentes en nuestro país son la cutánea, mucocutanea (presente en su mayoría en las regiones de la selva oriental) siendo la primera la más prevalente y en escasos casos la forma mucosa.

En el 2015, la región que más casos reportó fue Madre de Dios seguido por Cusco y Ancash, siendo la presentación clínica mucocutanea solo un 6.63% de los casos totales. Al 2016, a la semana epidemiológica seis las regiones con mayor prevalencia de casos fueron Cusco, Piura y Lima (Figuras 9,10).

Distribución de Leishmaniosis por distritos Perú 2016*



Total de casos: 368

FUENTE : Red Nacional de Epidemiología (RENACE) – DGE – MINSA
(*) Hasta la SE 06 del 2016

Figura 8.- Distribución de la leishmaniasis en el Perú al 2016

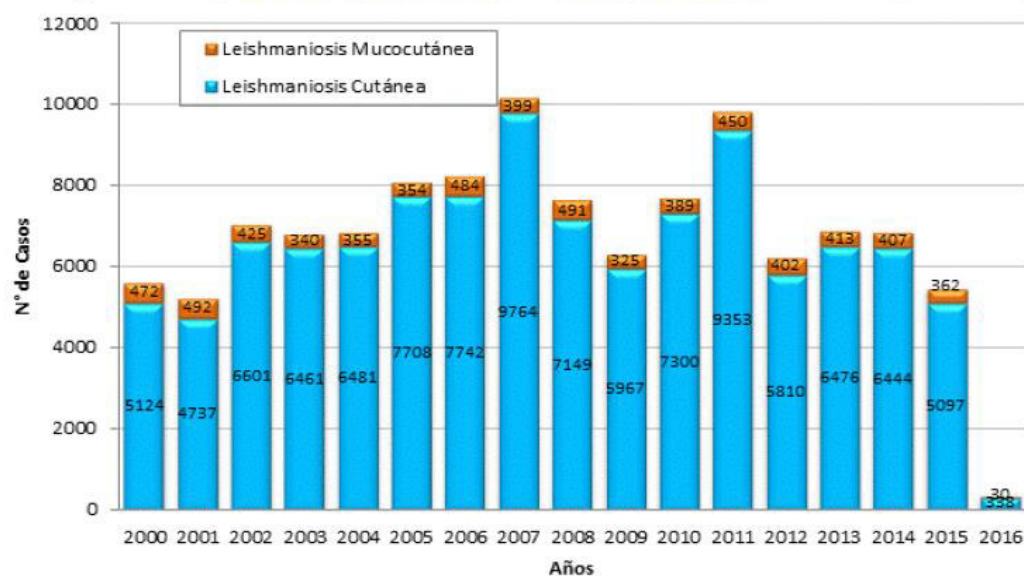
Leishmaniosis según departamentos Perú años 2005 – 2015 y 2016*

DEPARTAMENTOS	AÑOS											
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
SAN MARTIN	331	897	1758	881	392	1078	3192	577	617	702	347	11
CUSCO	962	1193	917	1081	985	999	967	951	894	765	563	56
PIURA	620	754	1246	543	665	736	783	549	644	555	350	46
MADRE DE DIOS	935	651	435	376	470	406	729	804	1020	698	729	34
JUNIN	471	956	663	894	777	702	786	502	485	376	348	16
CAJAMARCA	1073	755	895	614	428	597	719	417	384	496	420	23
ANCASH	894	606	1051	739	357	412	172	252	341	466	444	27
LIMA	530	331	745	451	354	481	262	247	393	362	328	42
AMAZONAS	364	319	381	308	275	566	620	378	324	366	297	21
LA LIBERTAD	386	255	961	455	355	382	242	237	251	308	255	26
HUANUCO	444	383	335	422	282	354	310	309	274	266	201	5
LORETO	276	411	290	285	305	261	381	329	257	287	237	14
UCAYALI	235	231	120	137	123	171	137	139	256	346	238	15
LAMBAYEQUE	268	132	98	132	120	100	152	93	186	376	279	8
PASCO	176	193	110	106	142	172	152	141	173	140	119	14
PUNO	18	30	67	119	185	180	103	174	272	201	158	3
AYACUCHO	66	100	64	76	65	60	73	82	95	112	123	5
APURIMAC	13	26	25	18	12	28	23	31	23	29	17	0
HUANCAVELICA	0	3	2	3	0	4	0	0	0	0	2	1
TACNA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
CALLAO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MOQUEGUA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AREQUIPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TUMBES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
ICA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total general	8062	8226	10163	7640	6292	7689	9803	6212	6889	6851	5459	368

FUENTE : Red Nacional de Epidemiología (RENACE) – DGE – MINSA
(*) Hasta la SE 06 del 2016

Figura 9.- Leishmaniasis por departamentos, periodos 2015-2016

Leishmaniosis según tipo de diagnóstico y años Perú años 2000 – 2015 y 2016*



FUENTE : Red Nacional de Epidemiología (RENACE) – DGE – MINSA
(*) Hasta la SE 06 del 2016

Figura 10.- Casos de leishmaniasis en el Perú según tipo desde el 2000 al 2016

DIAGNOSTICO DE LA LEISHMANIASIS

La identificación del agente etiológico en tejidos se puede realizar mediante la microscopía utilizando la coloración Giemsa o Wright que puede colorear los amastigotes, esta técnica es de rápido y sencillo desarrollo aunque poco sensible y específica (Figura 11) (Rojas, 2012). También se emplean técnicas como el cultivo en agar sangre bifásica, inoculación de modelos animales y detección molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En ocasiones se utiliza una combinación de las técnicas de diagnóstico, incluido los datos clínicos para un mejor estudio de la enfermedad (Guthmann, 2005; Gomes, 2014).

Entre los métodos más sensibles se destacan los cultivos (Figura 12) y la PCR, aunque el primero es susceptible a la contaminación y el tiempo diagnóstico para la detección del parásito es mayor comparado a la PCR que es de alta sensibilidad, especificidad y de diagnóstico rápido aunque el costo es relativamente alto y de mayor complejidad.

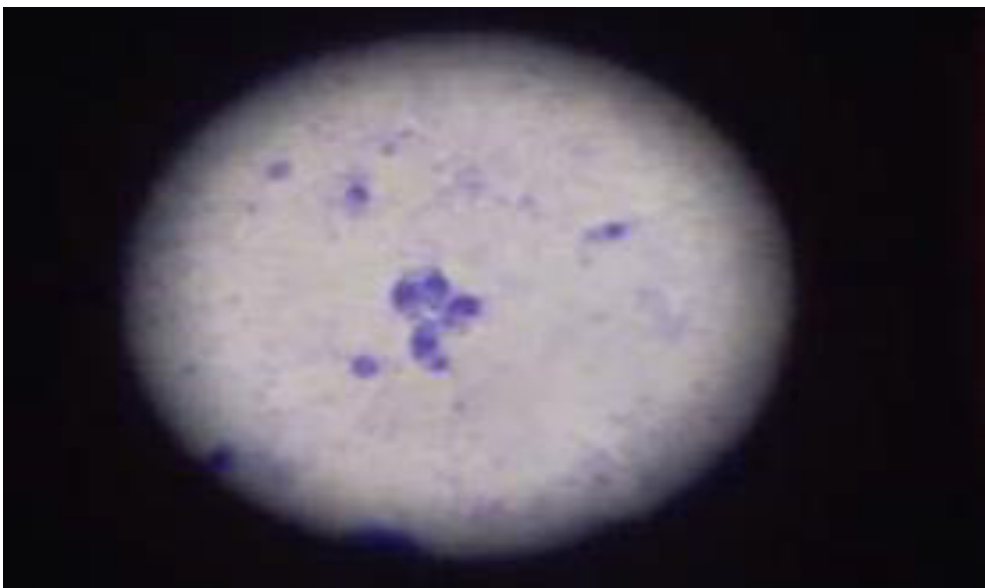


Figura 11.- Detección por microscopia de amastigotes de *Leishmania* sp. a 1000X, teñidos con colorante Giemsa.

El modelo animal es el método diagnóstico que requiere mas tiempo, entre 3 a 12 meses, aunque es de mucha importancia por la recuperación del parásito y el estudio de la fisiopatología (Figura 13) (Oliveira *et al.*, 2004). Finalmente es importante destacar la importancia de la identificación de la especie para el tratamiento adecuado y el seguimiento epidemiológico de la enfermedad (Montalvo, 2010).



Figura 12.- Promatigotes de *Leishmania* (V.) *braziliensis* en medio de cultivo observados bajo microscopio de contraste de fases. Fuente: Minaya *et al.*, 1997

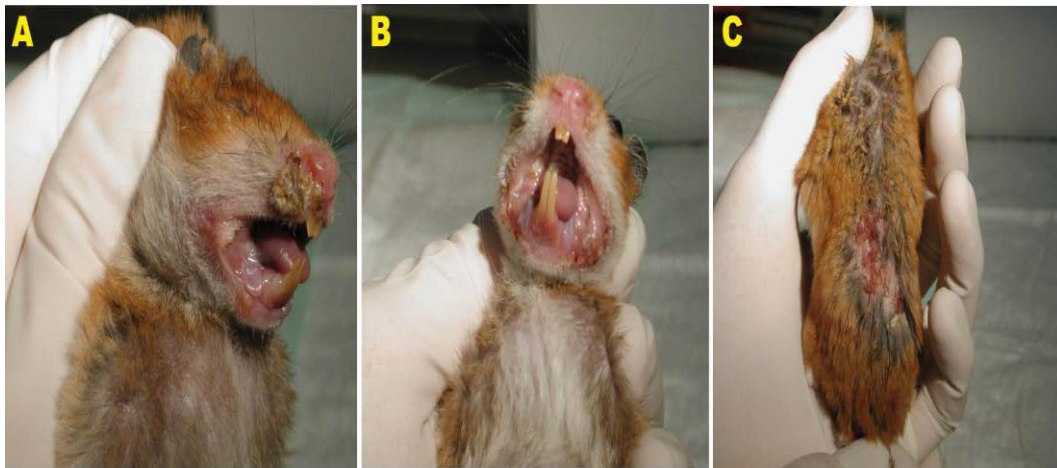


Figura 13.- Leishmaniasis en modelo animal. Fuente: Nieto *et al.*, 2011

Diagnóstico molecular

Entre las técnicas moleculares más usadas para la identificación de la especie de *Leishmania* sp. está el secuenciamiento del citocromo b mitocondrial por lo que se necesita una buena cantidad de la sección amplificada del kinetoplasto del parásito, y por tanto de mayor costo y complejidad que un PCR convencional (Goncalvez ,2014).

La PCR convencional que detecta ADN del minicirculo en el kinetoplasto (kDNA) del subgénero *Viannia* de *Leishmania* sp. es de mucha utilidad ya que el parásito presenta miles de copias y posee una alta sensibilidad y especificidad, generando un producto de 70pb (Figura 14) (Lopez *et al.*,1993). Otra técnica molecular de mucha utilidad en la identificación de especies de *Leishmania* sp. es la PCR en tiempo real, utilizada para demostrar la existencia de kDNA del kinetoplasto y ADN genómico de *Leishmania infantum* en *Rhipicephalus sanguineus*, colectados de perros asintomáticos (Solano-Gallego *et al.*, 2012; Trotta *et al.*, 2012).

Cabe destacar que la simplicidad, reproducibilidad, sensibilidad y la reducción de costo de las técnicas moleculares han sido mejoradas con el

advenimiento del PCR de Separación de Alta Resolución más conocido como “PCR-HRM” (Nasereddin *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2014). En el estudio molecular de *Leishmania* sp. se han diseñado variantes de la PCR para detectar el kDNA del parásito con el objetivo de identificar determinadas especies y mejorar la sensibilidad de la detección (Gualda *et al.*, 2015), entre los ejemplos, se puede citar su uso para discriminar entre los subgéneros *Leishmania* (*Leishmania*) y *Leishmania* (*Viannia*) mediante PCR en tiempo real, además de la cuantificación en tejidos (Ceccarelli *et al.*, 2014; Nicolas *et al.*, 2002).

Así también, se ha identificado el parásito en humanos, en reservorios como *Didelphis marsupialis* “zarigüeya” y *Dasypus novemcinctus* “armadillo” y dípteros utilizando otros segmentos genómicos de *Leishmania* sp. para diagnóstico y diferenciación molecular de las especies, como el gen que codifica la proteína de shock térmico (hsp) y secuencias del espaciador transcrito interno del RNA ribosomal (ITS) por su gran número de copias. Sin embargo, estos protocolos deben ser corroborados con la identificación del kDNA del parásito, debido a que el kinetoplasto es específico del orden Kinetoplastida (Zampieri *et al.*, 2016; Talmi-Frank *et al.*, 2010).

En Lima, Perú el Instituto de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de Guerra de los Estados Unidos (NAMRU 06) usa para la detección de especies dentro del subgénero *L.* (*Viannia*) la amplificación de los genes Manosa Fosfato Isomerasa “MPI” y a la 6 Fosfogluconato Deshidrogenasa “6PGD” utilizando el PCR en Tiempo Real, aunque por encontrarse en menor cantidad a nivel genómico se pierde sensibilidad al momento de

realizar el PCR comparado a la amplificación del kDNA (Figuras 15 y 16)
(López *et al.*,1993; Rodgers *et al.*,1990; Tsukayama *et al.*,2013).

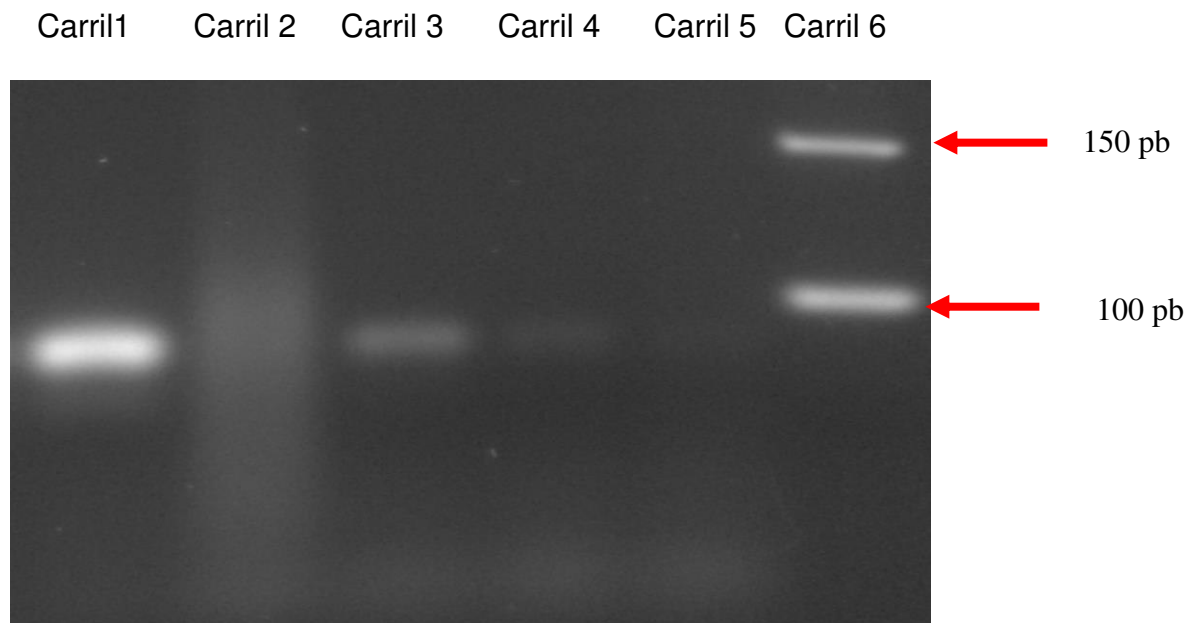
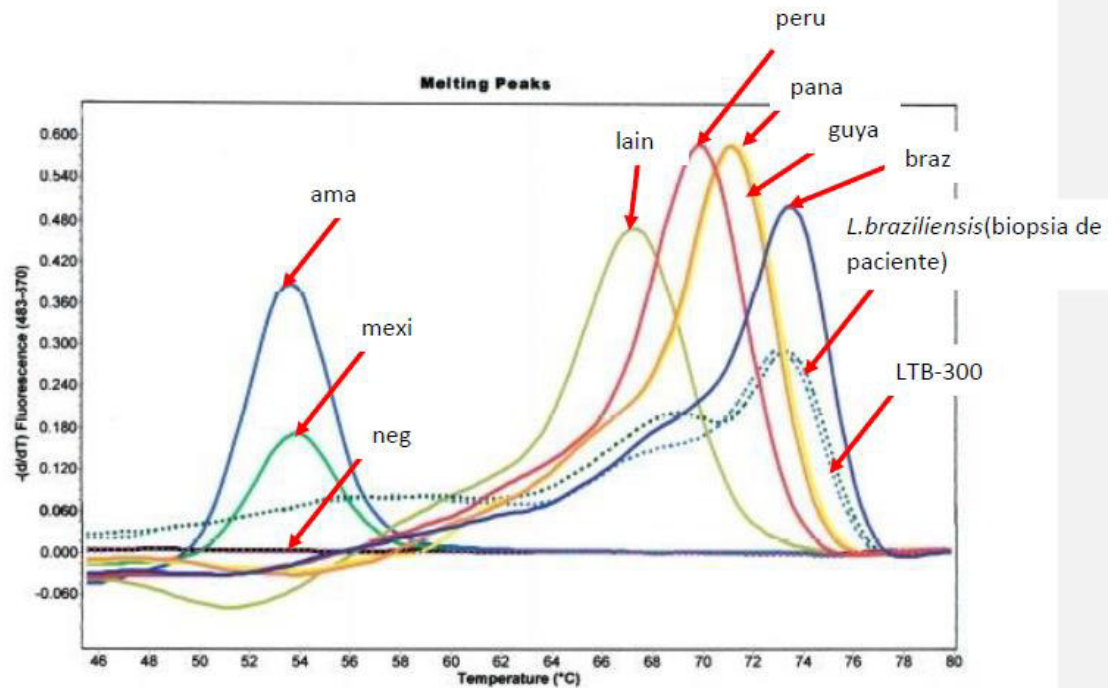
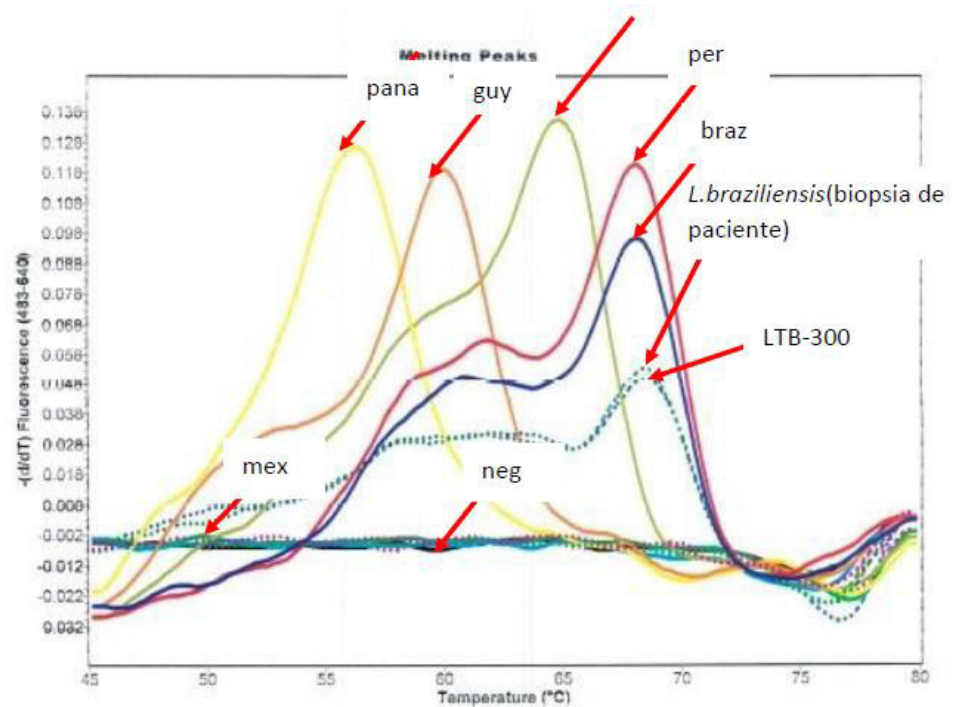


Figura 14.- Detección molecular por PCR para kDNA de *Leishmania* (*Viannia*):Carril 1 control positivo (70pb) *L. braziliensis*, carril 2 agua, carril 3 positivo, carril 4 positivo débil, carril 5 positivo muy débil y carril 6 marcador molecular de 150 y 100 pb. Fuente: López *et al.*, 1993



Curvas Melting para Manosa Fosfato Isomerasa " MPI". Curva negra control negativo, curva verde *L. mexicana*, curva celeste *L. amazonensis*, curva marron *L. lainsoni*, curva roja, *L. peruviana*, curva amarilla *L. panamensis*, curva naranja *L. guyanensis*, curva azul *L. braziliensis*. Curva punteada verde claro control positivo LTB-300 *L. braziliensis*, curva punteada verde oscuro DNA del paciente.

Figura 15.- PCR en Tiempo real amplificando el gen de la Manosa Fosfato Isomerasa de diferentes especies de *Leishmania* sp. Fuente: Tsukayama *et al.*, 2013



Curvas Melting para 6 Fosfogluconato Deshidrogenasa " 6PGD". Curva negra control negativo, curva verde *L. mexicana*, curva celeste *L. amazonensis*, curva marron *L. lainsoni*, curva roja, *L. peruviana*, curva amarilla *L. panamensis*, curva naranja *L. guyanensis*, curva azul *L. braziliensis*. Curva punteada verde claro control positivo LTB-300 *L. braziliensis*, curva punteada verde oscuro DNA del paciente.

Figura 16.- PCR en Tiempo real amplificando el gen de la 6 Fosfogluconato Deshidrogenasa para identificar diferentes especies de *Leishmania* sp.

Fuente: Tsukayama *et al.*, 2013

TRATAMIENTO Y PLAN DE INTERVENCIÓN CONTRA LA LEISHMANIASIS

El tratamiento para la enfermedad es de 20 días cuando es cutánea utilizando las drogas de primera línea que son antimoniales pentavalentes de primera línea como el estibogluconato de sodio o glucantime a dosis terapéuticas de 20mg/Kg con un máximo de 1250 mg/día, vía intravenosa o intramuscular. Si existe una recidiva previa evaluación clínica por tres meses el paciente es sometido a un tratamiento de antimoniales en la misma dosificación señalada anteriormente pero por 30 días. En caso de la leishmaniasis mucosa y visceral el tratamiento es parenteral con dosis de 20 mg/Kg con un máximo de 1250 mg /día por 30 días desde el inicio, debiendo realizarse un seguimiento al paciente pos tratamiento al 1, 3,6 y 9 mes debido a las frecuentes recidivas. En el caso de resistencia a las drogas de primera línea se utiliza la anfotericina B a 1mg/Kg intravenoso diluido en dextrosa por 30 días. El tratamiento con anfotericina requiere hospitalización y supervisión por ser altamente nefrotóxico y hepatotóxico así como provocar un desbalance de cationes en el cuerpo (Guthmann, 2005).

Para combatir la enfermedad se requiere de un programa de control integral y sostenido (intervención entomológica, farmacológica, diagnóstica, promocional y ecológica). Cuando el insecto se encuentra infectado, existe una alta probabilidad de infección al ser humano que en la mayoría de casos es de forma ocasional ya que el ser humano irrumpe en el nicho ecológico del insecto, motivo que demanda una intervención promocional de prevención de la enfermedad a la población en riesgo (WHO,2010). Sin embargo, estas acciones de promoción no son atendidas adecuadamente en muchas áreas del sector salud (WHO, 2010).

EL VÍNCULO ENTRE LAS GARRAPATAS Y LA LEISHMANIASIS

Las dificultades de control de la leishmaniasis se encuentran relacionadas a la compleja epidemiología de la enfermedad (parásito, reservorio, vector, medio ambiente y huésped). En los últimos años está creciendo el interés científico sobre el posible rol de los ectoparásitos en la epidemiología de la leishmaniasis (Silva de Moraes *et al.*, 2013; Dabaghmanesh *et al.*, 2016). En Brasil, la leishmaniasis visceral canina es endémica y un estudio demostró que *R. sanguineus* sería el transmisor de los patógenos a los perros en zonas donde existe esta enfermedad, con casos autóctonos en donde no se identificó la presencia de dípteros flebótomos como *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Campos *et al.*, 2014).

Aunque los dípteros son los únicos vectores adaptados y comprobados científicamente como los transmisores de *Leishmania* sp., algunos hallazgos recientes identificaron al parásito en otros artrópodos. Mediante el uso de la PCR convencional para la identificación del kDNA de *Leishmania* sp. se pudo detectar al parásito en el tábano, "*Tabanus importunus*". Del mismo modo, otros autores han detectado a *Leishmania braziliensis* en garrapatas "*Rhipicephalus sanguineus*", en pulgas "*Ctenocephalides felis*" y en piojos "*Heterodoxus spiniger*", mediante el uso de la PCR en tiempo real a otros artrópodos como posibles transmisores de la enfermedad (Silva de Moraes *et al.*, 2013; Coelho *et al.*, 2013). Un estudio en una zona endémica de leishmaniasis canina realizado en Italia demostró la presencia de *Leishmania infantum* en "*Rhipicephalus sanguineus*" (Solano-Gallego *et al.*, 2012). Otro

estudio similar detectó ADN de *Leishmania infantum* en "*Rhipicephalus sanguineus*" colectados de perros en Brasil (Gonçalves *et al.*, 2014); otros autores identificaron y secuenciaron el kDNA de *Leishmania infantum* a partir de *Ixodes ricinus* recolectados en gatos (Salvatore *et al.*, 2014).

Estos datos sugieren la hipótesis de que habrían otros artrópodos implicados en la transmisión de *Leishmania* sp. Es así que se ha encontrado una tasa del 50% de infección por *Leishmania* sp. en garrapatas de perros con leishmaniasis visceral canina con parásitos viables (en base al RNA del hemoparásito), quedando por dilucidar si estas garrapatas pueden actuar como vectores para la leishmaniasis visceral canina a pesar de tener tasas de infección más altas que las previamente descritas para *Lutzomyia longipalpis* (Colombo *et al.*, 2011).

Un reporte anterior menciona que en *Rhipicephalus sanguineus* ocurre transmisión transovárica de *Leishmania infantum*, habiéndose reportado ADN del kinetoplasto del parásito en hembras grávidas, huevos y larvas incidiendo en la viabilidad del parásito en el artrópodo el cual se vincula a la transmisión del parásito a los potenciales hospederos (Dantas-Torres *et al.*, 2011). En tal sentido, la hipótesis de *Rhipicephalus sanguineus* como un vector de *Leishmania infantum* está mostrando gran aceptación en los últimos años, más aún ante la rápida extensión de la leishmaniasis canina en áreas previamente libres de la enfermedad y la potencial evidencia de modos no tradicionales de transmisión (Dantas-Torres, 2011).

Un estudio sobre patógenos asociados a garrapatas en ambientes urbanos donde la serología y la PCR usadas en paralelo permitieron identificar infección por *Leishmania infantum* en perros jóvenes (Otranto *et al.*, 2010).

Adicionalmente en Italia se pudo evidenciar la detección del ADN de *Leishmania infantum* mediante la PCR en tiempo real en *Rhipicepalus sanguineus* colectados de perros con signos clínicos de enfermedad (Trotta *et al.*, 2012). Además, se ha reportado DNA del kinetoplasto de *Leishmania infantum* en glándulas salivales de *Rhipicepalus sanguineus* tanto en Italia como en Brasil, por lo que se hace necesario evaluar si las garrapatas podrían actuar como vectores de *Leishmania* sp. (Dantas-Torres *et al.*, 2010). Un estudio adicional también detectó la presencia de ADN de *Leishmania infantum* en *Rhipicepalus sanguineus* extraídos de perros en Brasil (Campos *et al.*, 2014). De otro lado, en Sudamérica la leishmaniasis canina está bien extendida habiéndose identificado *Leishmania infantum* y *Leishmania braziliensis*, y aunque el vector comprobado es *Lutzomyia longipalpis*, se ha diseminado la infección de ambientes rurales a ambientes silvestres en ausencia de *Lutzomyia* sp. (Dantas-Torres, 2009) lo que sugiere la potencial participación de otros artrópodos en la transmisión del hemoparásito.

3.- JUSTIFICACIÓN

La presente investigación proporciona evidencias acerca de la garrapata en ambientes silvestres donde estas podrían constituir la interface de transmisión de la leishmaniasis entre los ambientes silvestres y antrópicos (lugares donde reside la población humana) en la situación en la que personas se internan en el bosque para actividades como la caza, búsqueda de árboles maderables y oro, entre otros, y donde se pueden infestar con las garrapatas que se adquieren en el follaje de las plantas o de los animales que cazan .

La presente investigación también contribuye al conocimiento sobre los aspectos ecoepidemiológicos de la leishmaniasis, al estudiar al parásito causal de la enfermedad y su relación con las garrapatas colectadas de animales que viven en ambientes silvestres

Desde el punto de vista preventivo promocional, el presente estudio aportará datos que habría que tomar en cuenta para evitar el contacto con garrapatas en ambientes silvestres y antrópicos.

Finalmente, se podrán identificar áreas de riesgo para la transmisión de *Leishmania* sp. según la diversidad y abundancia de garrapatas.

4.-HIPÓTESIS

H₀: No es posible detectar ADN del kinetoplasto e identificar las especies de *Leishmania* sp. en garrapatas colectadas de *Tapirus terrestris* y *Pecari tajacu* en las provincias de Tahuamanú y Tambopata, región Madre de Dios.

H₁: Si es posible detectar ADN del kinetoplasto e identificar las especies de *Leishmania* sp. en garrapatas colectadas de *Tapirus terrestris* y *Pecari tajacu* en las provincias de Tahuamanú y Tambopata, región Madre de Dios.

5.-OBJETIVOS

Objetivo general:

Detectar e identificar por métodos o técnicas moleculares las especies de *Leishmania* sp. en garrapatas recolectadas en *Tapirus terrestris* y *Pecari tajacu* capturados en ambientes silvestres en las provincias de Tahuamanú y Tambopata, región Madre de Dios.

Objetivos específicos:

- Capturar e identificar taxonómicamente las garrapatas silvestres recolectadas en *Tapirus terrestris* y *Pecari tajacu* en ambientes silvestres en las provincias de Tahuamanú y Tambopata, región Madre de Dios.
- Efectuar la búsqueda de ADN del kinetoplasto de *Leishmania* (*Viannia*) sp. en garrapatas colectadas de *Tapirus terrestris* y *Pecari tajacu* en ambientes silvestres en las provincias de Tahuamanú y Tambopata, región Madre de Dios.
- Identificar especies de *Leishmania* sp. por técnicas de biología molecular en las garrapatas colectadas de *Tapirus terrestris* y *Pecari tajacu* en ambientes silvestres en las provincias de Tahuamanú y Tambopata, región Madre de Dios.

6.-MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.-Diseño del estudio

El presente estudio es de tipo descriptivo y de corte transversal. Se evaluaron garrapatas recolectadas de animales silvestres cazados con fines de subsistencia por los pobladores locales.

6.2.-Área de colecta

El estudio se llevó a cabo en dos lugares de la cuenca del río Tahuamanú ubicado en la región de Madre de Dios, cerca de la frontera con Bolivia: Sitio 1: Un área cercana a la ciudad de San Lorenzo (11 ° 27'13.73 "S y 69 ° 20'2.54 "O"; 285 msnm), capital del distrito de Tahuamanú, en la provincia de Tahuamanú. Sitio 2: pueblo Botijón (12 ° 07'12.95 "S 69 ° 04'31.47 y" O"; 267 msnm), cerca de la ciudad Planchón, la capital del distrito de Las Piedras, en la provincia de Tambopata. Los sitios de recolección están en una zona de bosque donde ocurre cacería de especies animales de la fauna silvestre local. El clima de la zona es húmeda y cálida, con una precipitación pluvial media anual de 1.600 mm y una temperatura media anual de 25 ° C (Figura 17).

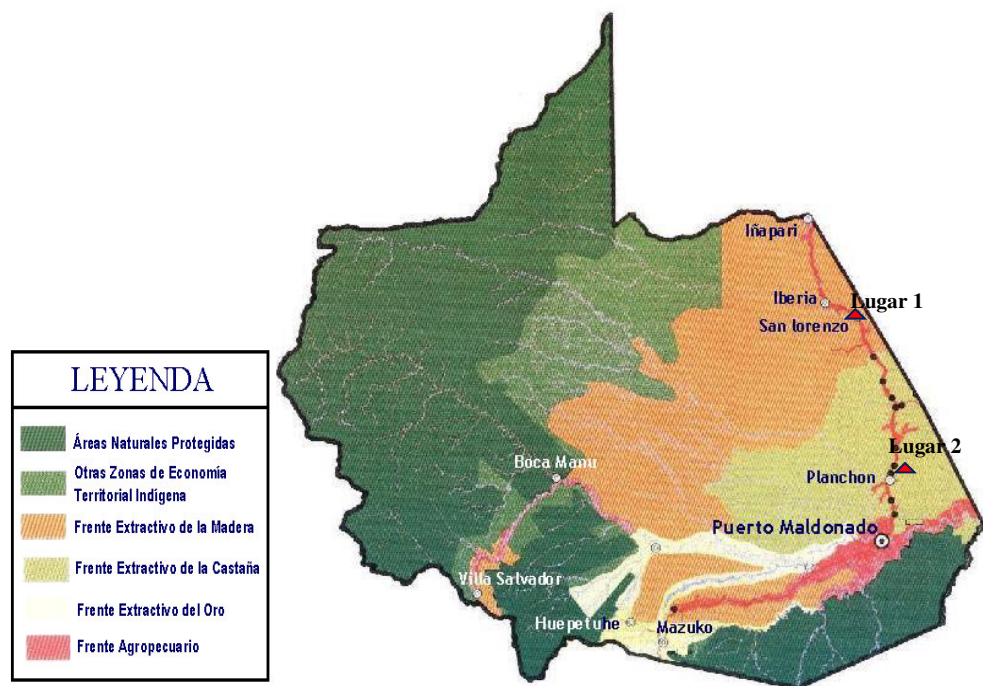


Figura 17.- Zonas Económicas y las localizaciones donde se realizaron las Colectas
(Fuente: ZEE-MDD, 2009)

6.3.-Colección de muestras y preparación para exámenes de laboratorio

En junio de 2012, se entró en contacto con la población local con el fin de realizar los arreglos necesarios para desarrollar la recolección de garrapatas de acuerdo al proyecto aprobado. Se establecieron los parámetros de trabajo considerando la ética y procesos regulatorios y se contó con las aprobaciones del comité de salud y ambiente del Gobierno Regional de Madre de Dios y del comité internacional de cuidado de animales en la investigación (IACUC) del U.S. Naval Medical Research Unit No. 6 (NAMRU-6; memorándum 072102). La captura de los animales silvestres fue realizado por caza local para autoconsumo; después del sacrificio del animal, se procedió a coleccionar las garrapatas con una pinza. Las garrapatas coleccionadas fueron

colocadas en forma individual en crioviales con alcohol etílico al 96% con un código que identifica el lugar de colecta y el animal de donde se obtuvo la muestra.

Los animales elegidos para la caza se basaron en el criterio que son los que más infestación de garrapatas presentan, su abundancia en la zona y la predisposición a dejar los ectoparásitos en las hojas de las plantas, siendo esto un factor de riesgo para la infestación por garrapatas en los humanos cuando realizan las actividades maderables, mineras, turismo y agricultura.

6.4.-Identificación de garrapatas

Todas las garrapatas fueron trasladadas al Laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud "INS-Lima-Perú", los especímenes se sacaron del criovial con alcohol colocándose en pequeñas placas Petri bajo el estereoscopio para observación a un aumento de 40X. Las estructuras taxonómicas principales usadas en la identificación de las garrapatas fueron; hipostoma, escudo, capitulo, coxas, tarso, placa espiracular y palpo según lo descrito por Barros-Battesti y et. al. (2006).

6.5.-Selección de las muestras para la detección del kDNA de *Leishmania* sp.

Después de la identificación taxonómica de las garrapatas recolectadas de *Tapirus terrestris* (105 garrapatas) y *Pecari tajacu* (67 garrapatas). Se eligió, en alternancia de géneros al azar, 40 garrapatas de *Tapirus terrestris* y 41 garrapatas de *Pecari tajacu*, tomando como criterio de exclusión los artrópodos en estadio de larvas y ninfas pequeñas en las que sería complicado la extracción de ADN. El número elegido de garrapatas (81) para la técnica molecular PCR kDNA fue debido a limitaciones logísticas y de reactivos.

6.6.-Protocolo para la identificación del ADN del Kinetoplasto de *Leishmania* sp

6.6.1.- Purificación del ADN de las muestras de garrapatas utilizando el kit Gentra Puregene (QIAGEN)

Las garrapatas fueron cortadas en 4 a 6 piezas y luego fueron colocadas en un microtubo de 1,5 ml, al cual se le añadió 300 uL de solución de lisis celular en el tubo. Dependiendo del tamaño de la garrapata se adicionó un volumen de proteinasa K (1.5uL, 5 uL o 20 uL), y se mezcló suavemente con el vórtex, se centrifugó, solo si fue necesario, y se incubó el tubo a 55 ° C durante toda la noche. Luego se añadió 100uL de la solución hipertónica para precipitación de proteínas agitándose vigorosamente durante 20 segundos y luego se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm. Se colectó el sobrenadante y se mezcló con 300uL de isopropanol frío y se agitó suavemente por inversión más 50 veces; se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm, y luego se en colocó en el congelador durante 1 hora a -10C⁰. Paso seguido, se desechó el sobrenadante con cuidado y se colocó el tubo invertido en un pedazo de papel toalla blanco y se dejó secar al aire durante 5 minutos. Se añadió 60uL de solución de hidratación “agua grado biología molecular” y se agito por 5 segundos. Finalmente se incubó a 65 ° C durante 1 hora para solubilizar el ADN.

6.6.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los cebadores usados fueron -MP1-L (directo) 5'-TAC TCC TGC CCG ACA CTC TG-3 y MP3-H (reverso) 5 'CGG GGT GAA TTC TGT ATG C-3'(López *et al.*, 1993).

El ADN de control usado fue *Leishmania (V.) braziliensis* cepa MHOM/BR/84/LTB300 (Cepa referencial del NAMRU 06) y ADN humano a partir de muestras negativas para la leishmaniasis

Para cada reacción de PCR, se usó un control positivo para *Leishmania (V) braziliensis* (cepa LTB300); un control negativo que consiste en ADN humano y un blanco (agua destilada, grado PCR) para revelar la contaminación cruzada.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final por reacción de 20 ul que contiene 4 DNA ul, 2 ul de tampón 10X PCR (Invitrogen), 1 ul de cada cebador (10 uM), 0,2 ul de Taq ADN polimerasa (5U / ul) (Invitrogen, Grand Island, NY), 0,6 ul de 50 mM de MgCl₂ y 2 ul de 1,25 mM de cada dNTP.

Las condiciones del termociclaje usadas en el termociclador GeneAmp ® PCR System 9700 según la programación fueron: Desnaturalización inicial a 94 C° durante 5 minutos y 35 Ciclos incluyendo: desnaturalización: 94 C ° durante 45 segundos, hibridación de Cebadores a 58 C° durante 45 segundos, extensión: 72 C° durante 1 minuto y temperatura final de extensión: 72 C° durante 5 minutos. Después se refrigeró a 4 C° hasta su uso para preservación del amplicon.

6.6.3.- Electroforesis

Se preparó un gel de agarosa al 1.5%. Se pesó 3 gr de agarosa y se mezcló con 197 ml de buffer TBE 1 X, se colocó en el microondas por 60 segundos para obtener una solución la cual se colocó en un molde para la obtención de un gel con seis pocillos y se utilizó un marcador de peso molecular de 50pb a 250pb

(invitrogen). Se colocó 5 ul de los productos de la PCR y 3 uL del marcador de corrida por pocillo. La corrida electroforética se realizó sobre el buffer TAE 1X a un voltaje constante de 100V durante 35 minutos, el gel fue sumergido en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0,5 mg/ml por 30 minutos (López *et al.*, 1993).

La presencia de una banda de 70 pb, cuando es comparada con el control positivo y con el marcador de peso molecular de 50 a 250 pb, indica un resultado positivo.

6.6.4.-Protocolo para identificación de especies usando la reacción en cadena de disociación de alta resolución “High Resolution Melting” (PCR- HRM)

El PCR HRM fue desarrollado con la colaboración de los investigadores Nisho Rojas-Palomino y Omar Cáceres Reyes de los laboratorios de leishmaniasis y biotecnología del Instituto Nacional de Salud-Lima-Perú, basados en una modificación del PCR desarrollado por Romero *et al.*, 2001.

El ADN purificado fue llevado a un PCR en tiempo real, a una concentración de 5ng/uL de ADN y 0.7uM de los primers OL1 – Directo 5´ GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3´ y OL2- Reverso 5´CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC 3´ (Cabrera *et al.*, 2002), en la reacción. Se empleó el fluoróforo Eva Green (Tipe-itHRMPCRkit;Qiagen), 35 ciclos: denaturalización a 95°Cx10seg., alineamiento a 55°C por 30seg y una extensión a 72°Cx10seg, seguido por un incremento progresivo de 1°C de temperatura en el intervalo de 75°C a 95°C, para lograr la denaturalización de la doble cadena del amplicón y la disociación del fluoróforo.

Para identificar las especies en las muestras problemas se utilizó un algoritmo de comparación que relaciona los espacios generados entre las curvas de las muestras controles y las muestras problemas. Los controles positivos usados fueron; LC 26 (*L. peruviana*), LC 53 (*L. braziliensis*), PH 8 (*L. amazonensis*), Lbg (*L. guyanensis*)

los cuales generan curvas definidas para cada especie que son dependientes de su valor de disociación relacionado a la secuencia de nucleótidos del producto amplificado de cada muestra a las que se aumentó la temperatura entre 75°C a 95°C. Cabe señalar que tanto los controles como las muestras a identificar fueron sometidos a las mismas condiciones de amplificación. Para definir una muestra como positiva relacionada a una especie de *Leishmania* sp, esta debe tener un valor de asociación al control >90%. Como control negativo se utilizó el agua.

El análisis de las curvas de disociación para la diferenciación de especies de *Leishmania* sp. se realizó a un intervalo de confianza de 90% mediante el software Rotor Gene Q versión V2.1.0.

7.-RESULTADOS

7.1.-Captura de animales silvestres y la recolección de las garrapatas

Se cazaron de tres Tapires (*Tapirus terrestris*) en el poblado de San Lorenzo del distrito de Tahuamanu, de la provincia de Tahuamanu y tres pecarí de collar (*Pecari tajacu*) en las zonas del centro poblado Botijón del distrito de Las Piedras de la provincia de Tambopata, en el lapso de una semana encontrándose un total de 304 garrapatas.

7.2.-Garrapatas utilizadas para el análisis de kDNA *Leishmania* sp.

De las 304 garrapatas colectadas, 136 fueron de *Tapirus terrestris* y 168 de *Pecari tajacu*. Solo 105 garrapatas de *Tapirus terrestris* y 67 garrapatas de *Pecari Tajacu* fueron identificadas taxonómicamente (tabla 2). De las especies identificadas en *Tapirus terrestris*, todas, excepto una que fue identificada como *Haemaphysalis juxtakochi*, pertenecían al género *Amblyoma* sp. mientras que en *Pecari tajacu*, se encontró solo el género *Rhipicephalus* sp.

En 41 garrapatas del genero *Rhipicephalus* sp., recolectadas de *Pecari tajacu* (Figura 18), y 40 garrapatas del genero *Amblyoma* sp., recolectadas de *Tapirus terrestres*, utilizadas en la PCR para identificar el kDNA de *Leishmania* sp. se observaron diferentes tamaños dependiendo del estadio de desarrollo .



Figura 18.- Garrapatas "*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*" recolectadas de *Pecari tajacu* mostrando diversos tamaños a escala con la regla de 20 centímetros, donde se puede observar una ninfa (flecha de color azul) y un adulto hembra (flecha de color rojo).

Tabla 2.- Garrapatas recolectadas y clasificadas taxonómicamente según Barros-Battesti (2006)

# de orden rotulación	Especie	Genero/estadio	Huésped/Nombre científico	Huésped/Nombre común	Procedencia
1	<i>Amblyomma naponense</i>	Macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
2	<i>Amblyomma naponense</i>	Macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
3	<i>Amblyomma naponense</i>	Macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
4	<i>Amblyomma naponense</i>	Macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
5	<i>Amblyomma naponense</i>	Macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
6	<i>Amblyomma naponense</i>	Macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
7	<i>Amblyomma naponense</i>	Macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
8	<i>Amblyomma naponense</i>	Macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
9	<i>Amblyomma naponense</i>	Macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
10	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
11	<i>Amblyomma naponense</i>	Hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
12	<i>Amblyomma naponense</i>	Hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
13	<i>Amblyomma naponense</i>	Hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
14	<i>Amblyomma naponense</i>	Hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
15	<i>Amblyomma naponense</i>	Hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
16	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	Hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
17	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
18	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
19	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
20	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
21	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
22	<i>Amblyomma</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo

	<i>scalpturatum</i>				
23	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
24	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
25	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
26	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
27	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
28	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
29	<i>Amblyomma ovale</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
32	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
33	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
35	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
36	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
37	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
38	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
39	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
40	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
41	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
42	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
43	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
44	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
45	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
46	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
47	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
48	<i>Rhipicephalus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón

	<i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>				
49	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
50	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
51	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
52	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
53	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
54	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
55	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
56	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
57	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
58	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
59	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
60	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
61	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
62	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
63	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
64	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón

65	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
66	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
67	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
68	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
69	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
70	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
71	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
72	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
73	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
74	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
75	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
76	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
77	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
78	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
79	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
80	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
81	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>)	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón

	<i>microplus</i>				
82	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
83	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
84	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
85	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
86	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	ninfa	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
87	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
88	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
89	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
90	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
91	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
92	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
93	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	ninfa	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
94	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
95	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
96	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
97	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón

98	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
99	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
100	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
101	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	ninfa	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
102	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
103	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
104	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
105	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
106	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
107	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	ninfa	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
108	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
109	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
110	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Botijón
111	<i>Amblyomma ovale</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
112	<i>Amblyomma</i> <i>scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
113	<i>Amblyomma</i> <i>scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
114	<i>Amblyomma ovale</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
115	<i>Amblyomma</i> <i>scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
116	<i>Amblyomma</i> <i>scalpturatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo

117	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
118	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
119	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
120	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
121	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
122	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
123	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
124	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
125	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
126	<i>Amblyomma ovale</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
127	<i>Amblyomma coelebs</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
128	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
129	<i>Amblyomma ovale</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
130	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
131	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
132	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
133	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
134	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
135	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
136	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
137	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
138	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
139	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
140	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
141	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
142	<i>Amblyomma</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo

	<i>latepunctatum</i>				
143	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
144	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
145	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
146	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
147	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
148	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
149	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
150	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
151	<i>Amblyomma coelebs</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
152	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
153	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
154	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
155	<i>Amblyomma coelebs</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
156	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
157	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
158	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
159	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
160	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
161	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
162	<i>Amblyomma naponense</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
163	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
164	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
165	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
166	<i>Amblyomma coelebs</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo

167	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
168	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
169	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
170	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
171	<i>Amblyomma naponense</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo
172	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	San Lorenzo

7.3.-Amplificación de kDNA de *Leishmania* sp.

Los resultados de la PCR kDNA mostraron que solo 3 ejemplares de garrapatas dieron positivas para *Leishmania* (*Viannia*) sp. (Figura 19, tabla 3). Los tres hallazgos procedieron de machos del género *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, colectados de Botijon en la Provincia de Tambopata lo que representa el 7.3%. En contraste todas las garrapatas del género *Amblyomma* sp. fueron negativas para el kDNA PCR (Tabla 4).

En el caso de la PCR-HRM del kDNA para identificar la especie, se encontró positiva, una de las tres muestras al género *Leishmania* sp., la especie *L. (V) guyanensis* (Figura 20, tabla 5).

Tabla 3.- Análisis Molecular del ADN Kinetoplasto de *Leishmania* sp. en las garrapatas.

#de orden de rotulación	Especie	Estadio/genero	Huésped/nombre científico	Huésped/nombre comun	Resultados kDNA PCR
1	<i>Amblyomma naponense</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
2	<i>Amblyomma naponense</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
3	<i>Amblyomma naponense</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
4	<i>Amblyomma naponense</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
5	<i>Amblyomma naponense</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
6	<i>Amblyomma naponense</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
7	<i>Amblyomma naponense</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
8	<i>Amblyomma naponense</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
9	<i>Amblyomma naponense</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
10	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
11	<i>Amblyomma naponense</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
12	<i>Amblyomma naponense</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
13	<i>Amblyomma naponense</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
14	<i>Amblyomma naponense</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
15	<i>Amblyomma naponense</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
16	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
17	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
18	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
19	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
20	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
21	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo

22	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
23	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
24	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
25	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
26	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
27	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
28	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
29	<i>Amblyomma ovale</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
32	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
33	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
35	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
36	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
37	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
38	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
39	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
40	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	hembra	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
41	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
42	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
43	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	macho	<i>Tapirus terrestris</i>	Sachavaca	Negativo
44	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
45	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
46	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
47	<i>Rhipicephalus (Boophilus)</i>	Hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo

	<i>microplus</i>				
48	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
49	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
50	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
51	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	Hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
52	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	Hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
53	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	Hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
54	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	Hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
55	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
56	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
57	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	Hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
58	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
59	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
60	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
61	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
62	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
63	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	Hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo

64	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
65	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	POSITIVO
66	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
67	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
68	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	Hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
69	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	Hembra	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
70	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
71	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
72	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
73	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
74	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
75	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	POSITIVO
76	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
77	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
78	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
79	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
80	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>)	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo

	<i>microplus</i>				
81	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	POSITIVO
82	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
83	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo
84	<i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>microplus</i>	macho	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	Negativo

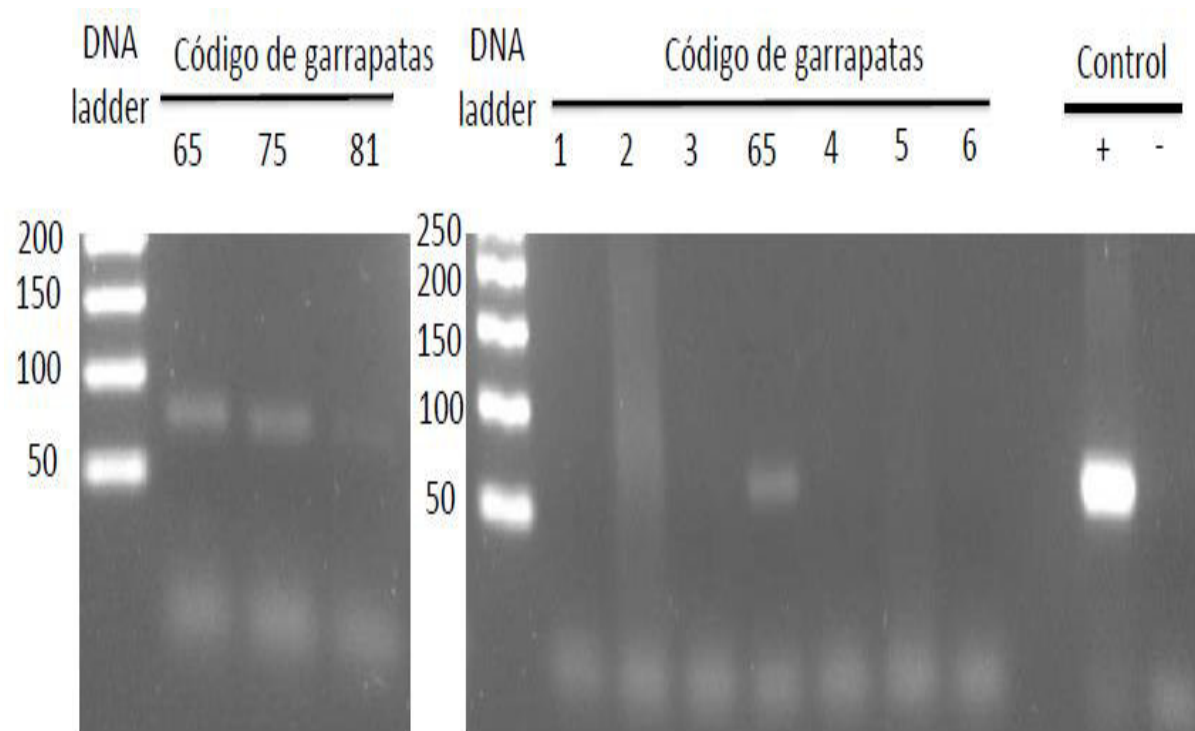


Figura 19.-. Detección por PCR de kDNA de *Leishmania* (*Viannia*) en garrapatas de animales silvestres cazados. La electroforesis en gel de agarosa muestran los productos amplificados de 70 pb del PCR kDNA. En el gráfico de la izquierda la primera columna muestra el ladder de 200pb a 50pb. El control positivo corresponde a ADN de *L. (V.) braziliensis* cepa (MHOM/BR/84/LTB300); y el control negativo corresponde a ADN humano negativo para *Leishmania* sp.

Tabla 4.- Garrapatas de acuerdo a los hospederos, localización de caza y resultados de PCR kDNA.

Especies	No. Garrapatas	Hospedero	Localización de Caza	PCR kDNA	Prevalencia de positivos
<i>Amblyomma naponense</i>	14	<i>Tapirus terrestris</i>	San Lorenzo	-	-
<i>Amblyomma sculpturatum</i>	18	<i>Tapirus terrestris</i>	San Lorenzo	-	-
<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	3	<i>Tapirus terrestres</i>	San Lorenzo	-	-
<i>Amblyomma latepunctatum</i>	4	<i>Tapirus terrestres</i>	San Lorenzo	-	-
<i>Amblyomma ovale</i>	1	<i>Tapirus terrestris</i>	San Lorenzo	-	-
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	41	<i>Pecari tajacu</i>	Botijón	3+	7%

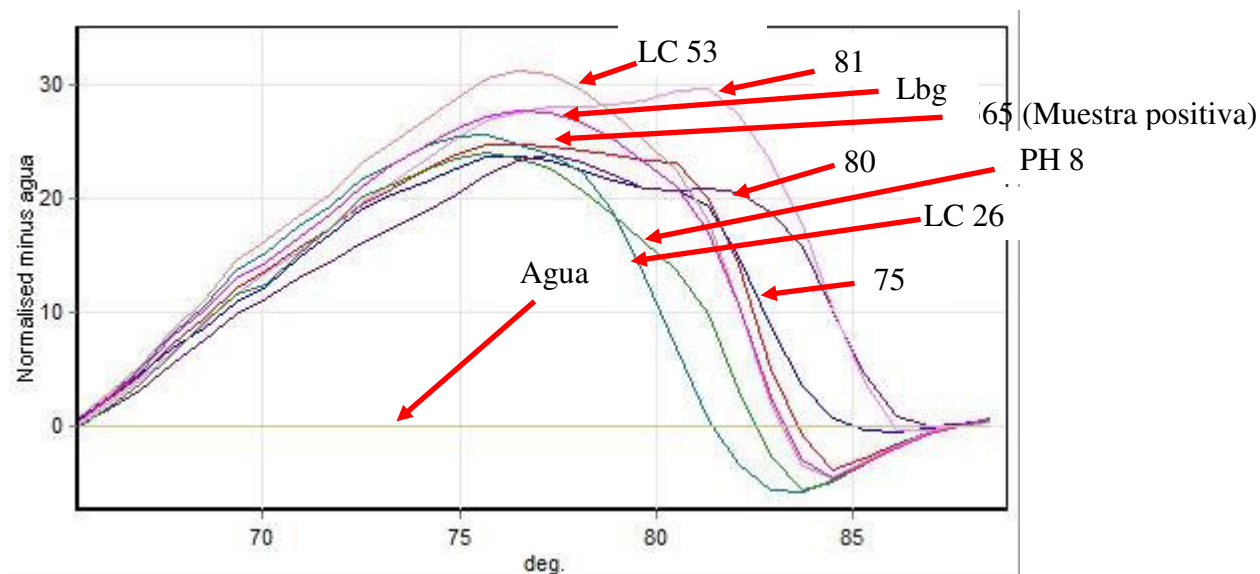











Figura 20.- Análisis HRM de garrapatas positivas a kDNA

Tabla 5.-Se muestra la relación entre el color y muestra usada en el HRM, debido a que el punto de corte de similitud entre las curvas de la muestra y control positivo es de 90%, la variación > 10% entre una muestra y el control descarta la similitud.

No.	COLOR	CODIGO	GENOTIPO	CONFIDENCIA %
1		Muestra 65	<i>L. guyanensis</i>	90.23
3		Muestra 75	Variación >10%	
4		80 Control negativo de <i>Leishmania</i> sp	Variación >10%	
5		Muestra 81	Variación >10%	
7		LC 26 (<i>L. peruviana</i>)	<i>L. peruviana</i>	100.00
8		LC 53 (<i>L. braziliensis</i>)	<i>L. braziliensis</i> A	100.00
9		PH 8 (<i>L. amazonensis</i>)	<i>L. amazonensis</i>	100.00
10		Lbg (<i>L. guyanensis</i>)	<i>L. guyanensis</i> A	100.00
13		Agua	agua	100.00

8.-DISCUSIÓN

En nuestro estudio las garrapatas infectadas con *Leishmania* sp. fueron únicamente machos, probablemente por su mayor capacidad de desplazamiento y la necesidad de búsqueda de alimento y pareja, aunque otros estudios previos han reportado la presencia de *L. infantum* en ambos sexos (Solano-Gallego *et al.*, 2012, Dantas-Torres *et al.*, 2011; Goncalves *et al.*, 2014).

Los resultados mostraron que 7.3% de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* fueron positivas al reconocimiento del ADN del kinetoplasto de *Leishmania (Viannia)* sp. dejando en claro que las especies etiológicas que causan leishmaniasis con mayor prevalencia en Perú son *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana* todas del subgénero *Viannia* (Lopez *et al.*, 1993). En un estudio al noreste de Brasil en el estado de Pernambuco, área endémica de leishmaniasis cutánea; se reportó usando la PCR en tiempo real a *L. braziliensis* en un 42.67% (32/75) de las garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* colectadas de perros (Silva de Moraes *et al.*, 2013). Otro estudio en Teresina, en el estado de Piauí, Brasil, identificó por PCR convencional, infección por *Leishmania* sp. (22.9%) en *R. sanguineus* colectados de perros positivos por serología y previamente diagnosticados con leishmaniasis visceral (Campos *et al.*, 2014). En Rio Grande do Norte, Brasil se detectó *L. infantum* por secuenciamiento tanto en la sangre de un perro como en las garrapatas *R. sanguineus* (66.7%) colectadas de estos animales; aunque solo se tuvieron muestras de dos perros con clínica no específica, las técnicas moleculares fueron importante para el diagnóstico correcto (Goncalves *et al.*, 2014).

Así mismo, en Brasil, en un estudio sobre la epidemiología de la leishmaniasis canina se encontró 15.4% de *R. sanguineus* infectados con *Leishmania* sp. usando PCR kDNA en perros que fueron diagnosticados previamente infectados con *L. chagasi* (Zanatta *et al.*, 2005). Por otro lado, un estudio en Grosseto, Italia central destacó también la importancia de la PCR en tiempo real usando sondas específicas para el kDNA de *L. infantum*, en la que se identificó infección en un 10.2% (13/128) de *R. sanguineus* colectados en perros en los que un grupo de ellos fueron seronegativos (Solano-Gallego *et al.*, 2012). Estos resultados indican que las garrapatas pueden presentar altos porcentajes de parasitemia, al encontrarse tanto el ADN del kinetoplasto que se degrada rápidamente cuando el amastigote del parásito muere o detectándose también el ARN del patógeno en diferentes fases del artrópodo como el adulto y las crías, lo que sugiere la viabilidad del parásito (Salvatore *et al.*, 2014). Así también, en un estudio previo se reportó la infección con *Leishmania* sp. en hámsteres a través de triturados de garrapatas colectados de perros infectados con *L. chagasi* por inoculaciones peritoneales y orales que dieron positivo por el PCR kDNA a nivel de bazo e hígado después de seis meses (Campos *et al.*, 2014; Solano-Gallego *et al.*, 2012 ; Zanatta *et al.*, 2005).

Un reciente estudio realizado en Brasil muestra un fuerte indicio que *Leishmania* sp. es viable en *R. sanguineus* y puede transmitir el protozoario a los mamíferos, el estudio detectó la forma de promastigote (fase infectiva del parásito a mamíferos) por inmunohistoquímica a nivel de las glándulas salivales, intestinos y ovarios en las garrapatas colectadas de perros en zonas endémicas de leishmaniasis visceral. Además la detección del parásito fue corroborada por RT-PCR (Araúz *et al.*, 2016).

En el presente estudio, el uso del PCR-HRM permitió identificar en una de las tres muestras positivas por PCR kDNA convencional a *Leishmania (V) guyanensis* como se mostró en la Figura 20. Por tanto, este es el primer estudio que reporta a esta especie del parásito en el artrópodo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A diferencia del PCR convencional que se utiliza para tipificar especies de *Leishmania* sp. que amplifican secuencias del ADN nuclear como el citocromo C, 18S RNA ribosomal y secuencias del ADN del maxicirculo citocromo B y citocromo oxidasa de la subunidad II; el PCR HRM para identificar especies utilizado en nuestro estudio se empleó para amplificar el kDNA del minicirculo resultando en una técnica de alta sensibilidad debido a que el minicirculo se encuentra en mayor cantidad comparados a los genomas nucleares y del maxicirculo, además de ser una técnica que consume poco tiempo y evita contaminaciones cruzadas como lo demuestran estudios previos (Cecarelli *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2016). Además debemos agregar que entre otras de las diferencias más destacadas del PCR-HRM está la capacidad de la técnica para diferenciar polimorfismos basados en un solo nucleótido (SNP), y que por no necesitar pasos extra, como la electroforesis es más rápida, económica y simple que un PCR convencional (Nasereddin *et al.*, 2010). Por tanto, se asume un mejor resultado de amplificación con el PCR-HRM.

Nuestro estudio en garrapatas de la especie *R. (B) microplus* que detectó el kADN de *Leishmania* sp. así como los estudios previos en *Rhipicephalus sanguineus*, indican que este artrópodo puede ser un vector de la leishmaniasis, debido a que se identificó por técnicas moleculares el ARN del parásito así como el ADN en crías de las garrapatas, suponiendo una infección transovarica y el estado viable del patógeno. Así también, se pudo identificar el promastigote que es la fase infectiva

para los mamíferos y que se desarrolla en el artrópodo (Araúz *et al.*, 2016; Salvatore *et al.*, 2014). En contraste, en otros artrópodos como *Tabanus importunus* se encontró el ADN del parásito pero no se pudo identificar la viabilidad de este, además de que solo se detectó amastigotes en el insecto, sabiendo que la fase infectiva del parásito que se encuentra en el vector generalmente es la de promastigote y que por tanto solo encontrar el parásito en forma de amastigote podría indicar una contaminación por succión del artrópodo y no necesariamente que sea un vector de la enfermedad (Colombo *et al.*, 2011; Dantas-Torres 2011; Coelho *et al.*, 2013).

Adicionalmente, dos estudios previos han demostrado la presencia de ADN de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania infantum* en *Rhipicephalus sanguineus* colectados en perros en tres zonas endémicas en Brasil lo que apoya la posibilidad de la participación de *Rhipicephalus sanguineus* en la transmisión de la leishmaniasis cutánea como visceral en zonas pobladas de la amazonia (Silva de Morais *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2014).

Es importante comparar las tasas de infección natural en *Lutzomyia* sp. y en especial en *Lutzomyia longipalpis* que es el díptero trasmisor de *Leishmania infantum* causante de la leishmaniasis visceral, enfermedad que es la que más reportes presenta de casos comparativos de identificación del parásito entre el díptero y la garrapata. Las tasas de infección natural en el díptero son de 0.28% en Venezuela, 0.29%-0.9% en Colombia y de 0.2% a 0.5% en Brasil, excepto lo reportado por "Lainson *et al.* (1985)" que fue de 7.1% (Zanatta *et al.*, 2005). En

contraste las altas tasas parasitarias encontradas en garrapatas en lugares donde el díptero vector estuvo ausente según reportes previos, suponen un papel más relevante de este artrópodo como transmisor del patógeno en la epidemiología de la leishmaniasis (Dantas-Torres, 2011).

Investigaciones en Brasil e Italia coinciden en mostrar que las garrapatas pueden ser portadoras de leishmaniasis visceral (Colombo *et al.*, 2011; Dantas-Torres *et al.*, 2010; Dantas-Torres *et al.*, 2011). Asimismo, la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, evaluada en el presente trabajo, es considerada la garrapata más importante del ganado bovino a nivel mundial y se encuentra en diversos hospederos tanto en ganado como animales domésticos y silvestres (Madder *et al.*, 2012).

El género *Rhipicephalus* sp. se distribuye a nivel mundial en las regiones tropicales y subtropicales tanto en Europa, principalmente en Italia como en América, principalmente en Brasil. Este género es conocido por ser vector de *Babesia bigemina*, *B. bovis* y *Anaplasma marginale* (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2014). En relación a la leishmaniasis, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* del perro ha sido implicada como un potencial vector de *L. (L.) infantum* (Dantas-Torres, 2011). Si se confirmara que esta garrapata es un vector, esto podría tener importancia para entender formas de transmisión poco conocidas de la leishmaniasis. La diversidad de hospederos de esta garrapata haría que potencialmente pudiera infectar con *Leishmania* sp. a múltiples especies de animales, incluidos los seres humanos. Esto podría afectar a pobladores dedicados a la agricultura y ganadería (en ambientes antrópicos) por contacto directo con el animal, y a personas que se dedican a la caza, actividad forestal, minera, investigadores de la biodiversidad, turistas (en ambientes silvestres), y otras

personas en contacto con vegetación donde puedan encontrarse las garrapatas (Labruna *et al.*, 2010).

En el presente estudio se identificó por primera vez para el Perú, *Leishmania* (*V*) *guyanensis* en garrapatas de la especie *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* del hospedero *Pecari tajacu* “sajino” aún considerando las dificultades que tuvimos que sortear para coleccionar y procesar el ADN del kinetoplasto del endoparásito; esta investigación apoya la hipótesis de la posible transmisión de especies patógenas de *Leishmania* al ser humano por garrapatas alojadas en mamíferos silvestres que son utilizados como alimentos por el hombre. Uno de los aspectos más relevantes de este estudio es la prevención del peligro del parasitismo al incrementarse no solo la caza de cerdos silvestres sino su crianza en granjas para alimento humano por lo que futuras investigaciones permitirán dar nuevas luces sobre la epidemiología de este parásito como problema de salud pública.

9.-CONCLUSIONES

Se identificó molecularmente por primera vez en el Perú a *Leishmania* (V) *guyanensis* en *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en tasas mayores de infestación que las reportadas para el vector natural que es díptero *Lutzomyia* sp .

Así mismo, es necesario resaltar que *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* fue colectado de *Pecari tajacu* en ambientes silvestres y por tanto consideramos un aporte al conocimiento de la distribución silvestre del parásito en una zona endémica de leishmaniasis como es el centro poblado Botijón del distrito de Las Piedras de la provincia de Tambopata, donde existen reportes orales que indican que en algunos casos la ulcera típica de la leishmaniasis cutánea aparece en la zona donde la garrapata desarrolló la picadura.

10.-RECOMENDACIONES

-Establecer un modelo animal que permita estudiar la transmisión del parásito a las garrapatas.

-Cultivar material colectado de las garrapatas que se encuentren en los humanos y en animales, para determinar la viabilidad del parásito.

-Queda por determinar el vínculo entre *Rhipicephalus* (*Boophilus*) y la leishmaniasis y el riesgo para el ser humano, en especial a las personas que se dedican a la caza, actividad maderera, turismo, minería y trabajos en flora y fauna que están en contacto con el follaje donde pueden encontrarse estas garrapatas.

11.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.-Alvar J. Las Leishmaniasis: De la biología al control.2a ed. Madrid. Instituto de Salud Carlos III; 2001
- 2.- Análisis y tendencias de la leishmaniasis, en el Perú, 2016. (Hasta la SE. N° 15 2016) [Internet] Bol Epidemiol (Lima). 2016; 1 (4): 1 –2[Citado el 20 de abril de 2016] Disponible en:
http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=121
- 3.-Araúz M, Guerrero F, Miranda de Oliveira B, Costa de Aquino M, Hudson S, Dias de Melo G, Gomez A, Takami C, Garcia M, Andreotti R, Félix de Lima V, Saraiva K. Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. Parasitol Res. 2016; 10(1):1-6
- 4.-Arevalo J, Ramirez I, Adui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with american tegumentary leishmaniasis. J Infect Dis. 2007; 195(12):1846 -51.
- 5.-Barros-Battesti D, Arzua M, Bechara G.H. Carrapatos de Importância Medico-Veterinaria da Região Neotropical: Um Guia Ilustrado para Identificação de Espécies.Volumen Sao Pablo, Vox/ICTTD- 3/ Butantan. 2006; Pp 223
- 6.-Berdjane-Broux Z, Koné A, Djimdé A. First Detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia* (*Spelaemyia*) darlingi from Cutaneous Leishmaniasis Foci in Mali. PLoS ONE. 2012; 7(1):1-5

- 7.-Bern C, Courtenay O, Alvar J. Of Cattle, Sand Flies and Men: A Systematic Review of Risk Factor Analyses for South Asian Visceral Leishmaniasis and Implications for Elimination. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(2):1-9
- 8.-Cabrera O, Munstermann L, Cárdenas R, Gutiérrrez R, Ferro C. Definición de las condiciones de temperatura y almacenamientos adecuadas en la detección de ADN de *Leishmania* por PCR en flebotominos. Biomédica. 2002; 22(3):296-302
- 9.-Campos J, Costa F. Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in Teresina, Piauí, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2014; 56(4):297-300
- 10.-Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR Green-Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. PLoS ONE. 2014; 9(2): 1-11
- 11.-Centro Informativo .Leishmaniasis. [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2015; 375 (Citado el 19 de abril de 2016) Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- 12.-Chang K, McGwire B. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. Kin Bio and Dis. 2002; 1(1):1-7
- 13.-Coelho W, Bresciani K. Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. In a dipteran of the species *Tabanus importunes*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2013; 22(4): 605-07
- 14.-Control of the leishmaniasis [Internet]. Report of a meeting of the expert committee on the control of leishmaniasis, Geneva, 22–26 march 2010. WHO technical report series 949. W Geneva. World Health Organization; 2010 [Citado el 20 de abril del

2016] Disponible en:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf

- 15.-Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, Galati EA, Canavez F, Pereira-Chiocola. Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs, *Parasitol Res.* 2011; 109(2):267-74
- 16.-Dantas-Torres F. Review: Canine leishmaniosis in South America, *Parasites & Vectors.* 2009; 2(1): 1-8
- 17.- Dabaghmanesh T, Asgari Q, Moemenbellah-Fard M, Soltani A, Azizi K. Natural transovarial and transstadial transmission of *Leishmania infantum* by naïve *Rhipicephalus sanguineus* ticks blood feeding on an endemically infected dog in Shiraz, south of Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2016) 110 (7): 408-13
- 18.-Dantas-Torres F, Testini LV, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, Mencke N, Brandao-Filho SP, Alves LC, Otranto D. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalum sanguineus* ticks from Brazil and Italy, *Parasitol Res.* 2010 ;106(4): 857-60
- 19.-Dantas-Torres F, Latrofa MS, Otranto D. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs, and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*, *Parasites & Vectors.* 2011; 4(56):1-4
- 20.-Dantas-Torres F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites, *Trends Parasitol.* 2011; 27(4): 155-9
- 21.-Diaz Y, Paternina M, Paternina L. Papel de los ectoparásitos (acari: ixodida) como transmisores de leishmaniasis visceral canina en Colombia. [Tesis de Bachiller para optar el grado de Biólogo] Facultad de educación y Ciencias Biológicas, Universidad de Sucre; 2008.

- 22.-Faiman R, Abbasi I, Jaffe C, Motro Y, Nasereddin A, Schnur LF, Torem M, Pratlong F, Dedet J-P, Warburg A. A newly emerged cutaneous leishmaniasis focus in northern Israel and two new reservoir hosts of *Leishmania major*. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(2):1-10
- 23.-Garcia de Marcos J, Dean A, Alamillos F, Ruiz J, Cortez B, Vidal A, Garcia A, Mancheno A. Localized leishmaniasis of the oral mucosa. A report of three cases. 2007. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2007; 12(1):281-286
- 24.-Gil LHS, Araújo MDS, Villalobos JM, Camargo LMA, Ozaki LS, Fontes CJF, et al. Species structure of sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in the Brazilian western Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(7): 955–9.
- 25.-Gomes C, Oliveira de Moraes O, Roselino A, Aparecida de Paula N, Ataíde Ribeiro R. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. An Bras Dermatol. 2014; 89(5): 701-11.
- 26.- Gonçalves LR, Filgueira KD, Ahid SMM, Pereira JS, Vale AM Do, Machado RZ, et al. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet [Internet]. 2014; 23(3): 407–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271465>
- 27.-Guerrero F, Andreotti R, Bendele K, Cunha R, Miller R, Yeater K, Pérez de León A. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. Parasites & Vectors. 2014; 7(1): 1-12
- 28.-Gualda K, Marcussi L, Neitzke-Abreu H, Aristides S, Lonardoni M, Cardoso R, Silverira T. New primers for detection of *Leishmania infantum* using polymerase chain reaction. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2015; 57(5): 377-83

- 29.-Guthmann J, Arlt D, Leon L, Rosales M, Sanchez J, Alvarez E, Lonlas S, Conte M, Bertolotti G, Fournier C, Huari R, Torreele E, Llanos-Cuentas A. Control of mucocutaneous leishmaniasis, a neglected disease: results of a control programme in Satipo Province, Peru. *Tropical Medicine and International Health*. 2005; 10 (9): 856-62
- 30.-Hernandez C, Alvarez C, González C, Ayala M, León C, Ramírez J. Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & Vectors*. 2014; 7(501): 2-7
31. -Kumar S, Kumar R, Kumar A. *Leishmania donovani*: How it makes fool to our Immune System. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 2012; 2(9): 1-4
- 32.-Labruna M, Romero M, Martins T, Tobler M, Ferrerira F. Ticks of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) infesting tapirs (*Tapirus terrestris*) and peccaries (*Tayassu pecari*) in Peru. *Systematic & Applied Acarology*. 2010; 15: 109-112
- 33.-Lainson R, Shaw J. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. A parasite of the armadillo, *dasypus novemcinctus* (L.) in amazonian Brazil. *Ann. Parasitol. Hum. Comp*. 1989; 64(1): 3-9.
- 34.-Lopes E, Geraldo C, Marcili A, Silva R, Keid L, Oliverira T, Soares R. Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 2016; 58(41):1-7
- 35.-Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A. Diagnosis the *Leishmania* Using the Polimerase Chain Reaction: A simplified procedure for field work. *Am Jour of Trop Med Hygien*. 1993; 49(3):348-356

- 36.-Madder M, Adehan S, De Deken R, Adehan R, Lokossou R. New Foci of *Rhipicephalus microplus* in West Africa. *Experimental and Applied Acarology*. 2012; 56(4): 385-390
- 37.-McCallL, Zhang W, Matlashewski G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. *PIOS pathogens*. 2013; 9(1):17
- 38.-Mcgwire B, Satoskar A. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Q J Med*. 2014; 107(1): 7–14
- 39.-Minaya G, Martinez-Vargas A, Cabezas C, Carrillo C, Chang J. Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de la leishmaniasis. Ministerio de Salud.1997; segunda edición-norma técnica numero 13:1-49
- 40.-Montalvo A. Leishmaniasis. Aspectos de interés sobre un parasitismo exótico para Cuba. *Rev Cub de Higiene y Epidemiología*. 2010; 48(1): 78-92
- 41.-Montenegro-Idrogo JJ, Montañez-Valverde R, Chian C, Benites-Villafane C. Leishmaniasis mucocutánea en un paciente con infección por VIH. *Rev Chil Infectol* [Internet]. 2014; 31(5): 610–4. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84914691339&partnerID=tZOtx3y1>
- 42.-Nasereddin A, Jaffe C. Rapid Diagnosis of Old World Leishmaniasis by High-Resolution Melting Analysis of the 7SL RNA Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48(6): 2240–42
- 43.-Nieto A, Domínguez-Bernal G, Orden J., et.al., Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/cmouse versus syrian hamster model. *Veterinary Research*. 2011; 42(39): 1-13

- 44.-Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. Journal of Clinical Microbiology. 2002; 40(5): 1666–69
- 45.-Oliveira C, Jania M, Gomez R, Barral A, Brodskyn C. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. Drug Discovery Today .2004: 1(1);81-86
- 46.-Otranto D, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa MS, Vissotto de Paiva Diniz PP, de Caprariis D, Lia RP, Mencke N, Gioia DS. Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. J Clin Microbiol. 2010; 48(9): 3316-24
- 47.-Organización Panamericana de la Salud [internet].Leishmaniasis en las Américas, recomendaciones para el tratamiento; 2013 [Citado el 22 de agosto de 2016] Disponible en:
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22226&Itemid&Itemid=270
- 48.-Rodgers M, Popper S, Wirth D. Amplification of Kinetoplastic DNA as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. Exper Parasit. 1990; 71(1): 267-75
- 49.-Rodríguez-Vivas R, Hodgkinson J, Trees A. Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia Acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Current status and mechanisms of resistance. Rev Mex Cienc Pecu. 2012; 3(1): 9-24
- 50.-Rojas J. Leishmaniasis: una enfermedad desatendida. Un acercamiento a la realidad en Huepetuhe, Madre de Dios. Rev Per de Epidemiología. 2012; 16(1):1-4
- 51.- Romero GA, Guerra MV., Paes M, Cupolillo E, Bentin Toaldo C, Macêdo VO, Fernandes O. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of

- cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Acta Trop. 2001; 79(3): 225–9.
- 52.-Salvatore D, Aureli S, Baldelli R, Di Francesco A, Tampieri MP, Galuppi R. Molecular evidence of *Leishmania infantum* in *Ixodes ricinus* ticks from dogs and cats, in Italy. Vet Ital [Internet]. 2014; 50(4): 307–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25546069>
- 53.-Schallig H, Da Silva E, Van De Meide W, Schoone G, Gontijo C. *Didelphis marsupialis* (Common Opossum): A Potential Reservoir Host for Zoonotic Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2007; 7(3): 387-93
- 54.-Simpson L. Structure and Function of Kinetoplast DNA. Cell. Organ. 1972: 25(1); 1-7
- 55.-Shapiro T. Kinetoplast DNA maxicircles: Networks within networks. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993; 90(1); 7809-13
- 56.-Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89: 471–8.
- 57.-Silva de Moraes R, Goncalves-de-Albuquerque S, Silva R, Costa P. Detection and quantification of *Leishmania braziliensis* in ectoparasites from dogs. Vet Para. 2013; 196(1): 506-08
- 58.-Solano-Gallego L, Rossi L, Scroccaro A, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, Trotta M. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. Parasites and Vectors. 2012; 5(98): 1-6

- 59.-Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schoonian G, Toz SO, Jaffe Ch, Baneth G. Detection and Identification of Old World *Leishmania* by High Resolution Melt Analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(1):1-5
- 60.-The Center for Food Security & Public Health (CFSPH). [Internet] Leishmaniasis (cutánea y visceral). Iowa state University. College of Veterinary Medicine. 2009; 1-13. [Citado el 19 de Abril de 2016] Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Infection_Control/index.php
- 61.-Tsukayama P, Nuñez J, De los Santos M, Soberón V, Lucas C. A FRET-Based Real-Time PCR Assay to Identify the Main Causal Agents of New World Tegumentary Leishmaniasis. PLOS NeglTrop Dis. 2013; 7(1): 1-9
- 62.-Trotta M, Nicetto M, Fogliazza A, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, et al. Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and *rickettsiae* in ticks removed from dogs living in Italy. Ticks Tick Borne Dis. 2012; 3(5-6): 294–7.
- 63.-Zampieri R, Laranjeira-Silva M, Muxel S, Stocco de Lima C, Shaw J, Floeter-Winter L. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(2): 1-18
- 64.-Zanatta M, Bueno L, Bueno L, Sterzik A, Fujiwara R, Botelho J, De Maria M, Genaro O, Linardi P. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. Veterinary Parasitology. 2005; 128(1): 149-55

12.-ANEXOS

12.1.-Memorandum de aceptación del procesamiento molecular de las garrapatas



DEPARTMENT OF THE NAVY

Memorandum

DATE: August 7th, 2012

FROM: Josefina Garcia, Chair, Institutional Animal Care and Use Committee

TO: Andres G. Lescano, Parasitology Department, NAMRU-6

SUB: Acknowledgement Memo of Reception of the memorandum "Processing tick samples collected from animals outside NAMRU-6" dated July 30th, 2012.

This is to inform you that the IACUC has received the memorandum "Processing tick samples collected from animals outside NAMRU-6". After reviewing the provided documentation, it was determined that this project will only be a collaborative effort for sample processing on a protocol already approved by the "Tambopata Reserve Society" (TreeS), and no actual animal manipulation/experimentation will be involved. As such, and in agreement to IACUC policies, this work does not require a protocol to be submitted for review and approval by the NAMRU-6 IACUC. However, the memorandum and additional documents will be kept for our records.

Please do not hesitate to contact me if you require more information.

JOSEFINA GARCIA
IACUC CHAIR

Copy to
OIC/IO
Attending Veterinarian
Protocol File

12.2.-Carta de información de captura de animales y aceptación para colecta de las garrapatas que se usó en el estudio emitido por la comisión de salud del gobierno regional de Madre de Dios



**GOBIERNO REGIONAL
MADRE DE DIOS
CONSEJO REGIONAL**

"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

CARTA 01-GRMDD-CRMDD-CHMDL

Por la presente se responde al señor Biólogo Jesús Eduardo Rojas Jaimes identificado con DNI: 41143948-CBP: 7917, con la solicitud 01-JERJ del 02 de Enero del 2014 con referencia a un permiso sobre el uso de un grupo de muestras entomológicas colectadas en el año 2012, resolviendo:

- Se le autoriza el uso de muestras entomológicas colectadas en el año 2012 en el distrito de San Lorenzo, Provincia de Tahuania y el distrito de las Piedras, Provincia de Tambopata, con el conocimiento que las muestras fueron recolectadas de 6 animales cazados (3 *Tapirus terrestris* y 3 *Tayassu tajacu*) en áreas no protegidas y como parte del autoconsumo local.
- Los artrópodos colectados (garrapatas) serán usados para estudios con fines científicos enmarcados en la Salud Pública, Epidemiología, Taxonomía, Ecología, Conservación y Genética, con la consecuente producción de conocimiento que servirá para la prevención de enfermedades transmitidas por los artrópodos colectados y la conservación de los animales en estudio.

Se emite la presente carta para los fines acordados.

Puerto Maldonado 10 de Enero del 2014

GOBIERNO REGIONAL DE MADRE DE DIOS
Órgano de Salud Pública, Desarrollo Social
Bogotá, Colombia y Oficina C-10



ALCALDE
Miguel Ángel Manrique de Lara
Presidente

Epidemiólogo Carlos Manrique de Lara

Presidente de la Comisión de Salud del Gobierno Regional de Madre de Dios

**CONSEJO REGIONAL MADRE DE DIOS
JR. GUILLERMO BILLINGHURST N° 480
TELEFAX 082573190**